


Martina Tiefenbach

Die Succinatdehydrogenase als Mediator in der pulmonalen hypoxischen Vasokonstriktion

Eine Arbeit mit Succinatdehydrogenase-D gendefizienten
Mäusen (SDHD +/-) am Modell der isoliert perfundierten
Lunge und in histologischer Betrachtung



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



schönheit verbindet
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die Succinatdehydrogenase als Mediator in der pulmonalen hypoxischen Vasokonstriktion

—

Eine Arbeit mit Succinatdehydrogenase-D gendefizienten Mäusen
(SDHD +/-) am Modell der isoliert perfundierten Lunge und in
histologischer Betrachtung

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Martina Tiefenbach

aus Düsseldorf

Gießen 2016

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. N. Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Schmitz

Tag der Disputation: 11.05.2016

- für meine Mutter und meinen Vater -

Inhalt	Seite
1. Einleitung	1
1. 1 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	1
1. 2 Die pulmonale Hypertonie (PH)	1
1. 2. 1 Definition der pulmonalen Hypertonie	1
1. 2. 2 Dana Point Klassifikation (2009) der pulmonalen Hypertonie	1
1. 3. Verschiedene Formen der Vasokonstriktion in den Lungengefäßen unter Hypoxie	3
1. 4 Spezifische medikamentöse Therapiemöglichkeiten der PH	3
1. 4. 1 Prostacycline	4
1. 4. 2 Endothelin-Rezeptorantagonisten	4
1. 4. 3 Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren	5
1. 4. 4 Kalziumantagonisten	5
1. 4. 5 Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase	5
1. 5 Regulationsmechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion	6
1. 5. 1 NADP(H)-Oxidasen	6
1. 5. 2 Mitochondriales Sauerstoffsensing	7
1. 5. 2. 1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion und Mitochondrien	7
1. 5. 2. 2 Kalzium und Mitochondrien	8
1. 5. 2. 3 Mitochondriale ATP-Produktion	8
1. 5. 3 Kalzium	8
1. 5. 4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	9
1. 5. 4. 1 ROS als Produkt der NADP(H)-Oxidase	9
1. 5. 4. 2 ROS als Produkt der mitochondrialen Atmungskette	10
1. 6 Schwerpunkt dieser Arbeit	12
1. 6. 1 Die Succinatdehydrogenase (SDH)	12
1. 6. 1. 1 Schematische Darstellung der SDH	12
1. 6. 1. 2 Vorkommen der SDH	13
1. 6. 1. 3 Funktion der SDH	13
1. 6. 1. 4 SDH unter hypoxischen Bedingungen	14
1. 6. 1. 5 Funktionsweise der SDH im Hinblick auf die HPV	14
1. 6. 2 Das Succinatdehydrogenase D (SDHD)-Gen	15
1. 6. 3 Bekannte Folgen einer Mutation des SDHD-Gens beim Menschen	16
1. 7 In dieser Arbeit verwendete Tiere	16
1. 7. 1 Herkunft der verwendeten Tiere	17
1. 7. 2 Genetische Eigenschaften der Tiere	17
1. 7. 3 Funktionelle Eigenschaften der Tiere	17

1. 7. 4 Glomus caroticum Eigenschaften der Tiere	17
2. Material und Methoden	19
2. 1 Versuchstiere	19
2. 1. 1 Herkunft	19
2. 1. 2 Herstellung der genetischen Veränderung	19
2. 1. 3 Nachzucht und Haltung	19
2. 1. 4 Haltung der Mäuse in Hypoxie- und Normoxiekammern	19
2. 1. 5 Genotypisierung der Mäuse	19
2. 2 Tierversuchsgenehmigungen	20
2. 3 Materialien	20
2. 3. 1 Geräte	20
2. 3. 2 Verbrauchsmaterialien	21
2. 3. 3 Präparationsmaterialien	22
2. 3. 4 Pharmaka, Chemikalien und Gase	22
2. 3. 5 Materialien für die Histologie	23
2. 3. 5. 1 Allgemeine Materialien	23
2. 3. 5. 2 Antikörper	24
2. 3. 5. 3 Zambonis Fixativ	24
2. 3. 5. 4 Geräte	24
2. 4 Das Modell der isolierten Mauslunge	25
2. 4. 1 Einführung	25
2. 4. 2 Versuchsaufbau	26
2. 4. 3 Instandhaltung des Systems	27
2. 4. 4 Präparation der Mauslunge	27
2. 4. 4. 1 Anästhesie, Muskelrelaxation und Antikoagulation	27
2. 4. 4. 2 Intubation	27
2. 4. 4. 3 Perfusion und Präparation der Lunge	28
2. 4. 5 Aufwärmphase	29
2. 4. 6 Aufzeichnung	29
2. 4. 7 Ausgangsbedingungen	29
2. 4. 8 Verwendung von U-46619 und N ω -Nitro-L-Arginine (L-NNA)	30
2. 4. 8. 1 U-46619	30
2. 4. 8. 2 N ω -Nitro-L-Arginine (L-NNA)	30
2. 5 Versuchsabläufe an der isoliert perfundierten Lunge	30
2. 5. 1 Adaptionsphase	30
2. 5. 2 Umstellung zwischen Normoxie (21%O ₂) und Hypoxie (1%O ₂)	30
2. 5. 3 Überblick über die Versuche unter akuter hypoxischer Ventilation und U-46619-induzierter Vasokonstriktion mit und ohne Gegenwart von L-NNA	31
2. 5. 4 Akute hypoxische Vasokonstriktion	32
2. 5. 5 Versuche mit U-46619	32
2. 5. 5. 1 Verdünnung und Zugabe von U-46619	32

2. 5. 5. 2 Versuchsablauf	32
2. 5. 6 Versuche zur akuten hypoxischen Beatmung in Gegenwart von L-NNA	33
2. 5. 6. 1 Verdünnung und Zugabe von L-NNA	33
2. 5. 6. 2 Versuchsablauf	33
2. 5. 7 Versuche in Gegenwart von L-NNA und unter Zugabe von U-46619	34
2. 5. 7. 1 Zugabe von U-46619	34
2. 5. 7. 2 Versuchsablauf	34
2. 5. 8 Dreistündige Hypoxie	34
2. 5. 9 Dreistündige Normoxie	35
2. 6. Hypoxieinduzierte pulmonale Hypertonie bei SDHD+/- und Wildtypmäusen	35
2. 6. 1 Wiegen der Mäuse	35
2. 6. 2 Messung des Drucks im rechten Ventrikel	36
2. 6. 2. 1 Narkose, Muskelrelaxation, Antikoagulation	36
2. 6. 2. 2 Beatmung	36
2. 6. 2. 3 Präparation des rechten Ventrikels und Einbringen der Messkanüle	36
2. 6. 2. 4 Messung des rechtsventrikulären Drucks	37
2. 6. 3 Präparation von Lunge und Herz	37
2. 6. 3. 1 Vollständige Eröffnung des Thorax	37
2. 6. 3. 2 Bestimmung des Hämatokrits	38
2. 6. 3. 3 Spülung der Lunge und des Herzens mit Perfusat	38
2. 6. 3. 4 Spülung der Lunge und des Herzens mit Zambonis Fixativ	38
2. 6. 3. 5 Freipräparation von Lunge und Herz	38
2. 6. 3. 6 Trennung der Lunge vom Herzen	38
2. 6. 3. 7 Einlagerung der Lunge	38
2. 6. 4 Präparation und Auswiegen des Herzens	38
2. 6. 5 Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Lunge	39
2. 6. 5. 1 Einbettung der Gewebe	39
2. 6. 5. 2 Anfertigung von Schnittpräparaten	39
2. 6. 5. 3 Entparaffinierung und Rehydrierung	39
2. 6. 5. 4 Immunhistochemie	40
2. 6. 6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße	41
2. 6. 6. 1 Muskularisierungsgrad	41
2. 6. 7 Statistische Auswertung	42
3. Ergebnisse	43
3. 1 Zusammenfassung ermittelter Parameter	43
3. 1. 1 Isoliert perfundierte Lunge	43
3. 1. 2 Chronische, durch Hypoxie induzierte pulmonale Hypertonie	43
3. 2 Versuche zur akuten hypoxischen Ventilation	43

3. 3 Versuche mit dem Thromboxanalogon U-46619	45
3. 4 Akute hypoxische Vasokonstriktion im Vergleich zur Vasokonstriktion ausgelöst durch U-46619 in normoxisch und hypoxisch gehaltenen Mäusen	47
3. 5 Versuche zur akuten hypoxischen Beatmung in Gegenwart von L-NNA	50
3. 6 Versuche zur U-46619-induzierten Vasokonstriktion in Gegenwart von L-NNA	52
3. 7 Akute hypoxische Vasokonstriktion im Vergleich zur Vasokonstriktion ausgelöst durch U-46619 in Gegenwart von L-NNA	54
3. 8 Vergleich zwischen Vasokonstriktion durch akute hypoxische Beatmung und U-46619-induzierte Vasokonstriktion mit und ohne Gegenwart von L-NNA	56
3. 9 Pulmonalarterieller Druckanstieg unter dreistündiger hypoxischer Ventilation	57
3. 9. 1 Dreistündige hypoxische Ventilation	58
3. 9. 2 Dreistündige normoxische Ventilation	58
3. 10 Versuchsergebnisse von SDHD+/- Tieren und Wildtypen beider Haltungformen mit histologischer Auswertung der Vaskularisierungsgrade	59
3. 10. 1 Hämatokritwerte der Tiere	59
3. 10. 2 Messung des rechtsventrikulären Drucks	60
3. 10. 3 Gewicht des rechten und linken Ventrikels inkl. Septum	61
3. 10. 4 Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum linken Ventrikel	62
3. 10. 5 Differenz im Körpergewicht der Tiere beider Haltungformen	63
3. 10. 6 Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht	64
3. 10. 7 Histologische Auswertung	65
3. 10. 7. 1 Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70µm)	65
3. 10. 7. 2 Muskularisierungsgrad der mittleren Gefäße (>70-150µm)	66
3. 10. 7. 3 Muskularisierungsgrad der großen Gefäße (>150µm)	67
4. Diskussion	69
4. 1. Die isoliert perfundierte Lunge	70
4. 2 Diskussion zur histologischen Evaluation	74

4. 3 Ausblick	77
5. Zusammenfassung	79
6. Summary	81
7. Verzeichnisse	83
7. 1 Abkürzungsverzeichnis	83
7. 2 Abbildungsverzeichnis	87
7. 3 Literaturverzeichnis	90
8. Veröffentlichungen	101
9. Erklärung	102
10. Danksagung	103
11. Lebenslauf	104

1. Einleitung

1. 1 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Im Jahr 1946 beschrieben von Euler und Liljestrand am Modell der Katze die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) [1] und mit sehr wenigen Ausnahmen zeigten die nachfolgend untersuchten Säugetierspezies die gleiche Reaktion auf Hypoxie [2]. Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht möglich gewesen, den zu Grunde liegenden Mechanismus vollständig zu erklären [3], [4].

Die Lunge weist die Eigenschaft auf, auf eine Minderbelüftung von Alveolen mit einer Vasokonstriktion der präkapillären Gefäße zu reagieren. Die Gefäße der Lunge verhalten sich damit gegensätzlich zu anderen Organen, die auf eine Hypoxie meist mit einer Vasodilatation reagieren. Dieser Mechanismus der Lunge ist physiologisch sinnvoll, da er die Anpassung der Perfusion an das Sauerstoffangebot in den Lungenarealen garantiert und somit eine ausreichend hohe Oxygenierung des Blutes für den Körperkreislauf gewährleistet [5].

1. 2 Die pulmonale Hypertonie (PH)

1. 2. 1 Definition der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie ist ein hämodynamischer und pathophysiologischer Zustand, bei dem sich der mittlere pulmonalarterielle Druck (PAP) in Ruhe auf $\geq 25\text{mmHg}$ erhöht hat.

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) (Gruppe 1 der Dana Point Klassifikation, s. 1.2.2) ist eine klinische Diagnose, die sich durch eine präkapilläre pulmonale Hypertonie stellen lässt. Diese ist definiert durch einen mittleren PAP von $\geq 25\text{mmHg}$ sowie einen pulmonalarteriellen Verschlussdruck von $\leq 15\text{mmHg}$ und normale bis reduzierte CO-Werte ohne das Vorkommen einer anderen zugrundeliegenden Lungenerkrankung (z.B. chronische Thrombembolien) [6].

1. 2. 2 Dana Point Klassifikation (2009) der pulmonalen Hypertonie

Die heute gültige Klassifikation der PH wurde 2009 auf dem 4th World Symposium zu pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) in Dana Point zusammengestellt [7].

Die pulmonale Hypertonie wird hier in 5 Klassen eingeteilt:

1) Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

1. 1) Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie

1. 2) Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH)

1. 2. 1) Bone morphogenetic protein receptor type II (BMP2)- Mutation

1. 2. 2) Activin receptor-like kinase type 1 (ALK-1), Endoglin-Mutation
(mit oder ohne hereditäre hämorrhagische Teleangiectasien)

1. 2. 3) Unbekannte Mutationen

1. 3) Arzneimittel- und Toxin-induziert

1. 4) Assoziierte Pulmonalarterielle Hypertonie (APAH) bei:

1. 4. 1) Kollagenosen

1. 4. 2) HIV-Infektionen

1. 4. 3) Portaler Hypertonie

1. 4. 4) Angeborenen systemisch-pulmonalen Shunts (u.a. Herzfehlern)

1. 4. 5) Bilharziose

1. 4. 6) Chronisch hämolytischer Anämie

1. 5) Persistierender pulmonalarterieller Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

1') Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und / oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)

2) Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens

2. 1) Systolische Dysfunktion

2. 2) Diastolische Dysfunktion

2. 3) Herzklappenerkrankungen (Mitral- oder Aortenklappenfehler)

3) Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/ oder Hypoxie

3. 1) Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

3. 2) Interstitielle Lungenerkrankungen

3. 3) Andere, restriktiv und obstruktiv gemischte, pulmonale Erkrankungen

3. 4) Schlafbezogene Atemstörungen

3. 5) Alveoläre Hypoventilationssyndrome

3. 6) Chronischer Aufenthalt in großer Höhe

3. 7) Anlagebedingte Fehlbildungen

4) Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)

5) Pulmonale Hypertonie mit unklaren oder multifaktoriellen Mechanismen

5. 1) Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
5. 2) Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitiden
5. 3) Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
5. 4) Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit Dialyse

1. 3 Verschiedene Formen der Vasokonstriktion in den Lungengefäßen unter Hypoxie

Zeitabhängig können in vielen Untersuchungsmodellen zwei oder drei Formen der Gefäßreaktion auf eine alveoläre Hypoxie unterschieden werden [8]–[10]:

Innerhalb von Sekunden kommt es zu einer akuten Vasokonstriktion, die ihr Maximum in der 4.- 6. Minute erreicht. Anschließend kann es, je nach Untersuchungsmodell, zu einer verlängerten hypoxischen Vasokonstriktion Minuten bis zu Stunden nach Einsetzen der Hypoxie kommen. Es handelt sich dann um eine biphasische Vasokonstriktion, bei der es nach anfänglicher akuter Vasokonstriktion zunächst zu einer mäßigen Vasodilatation kommt, die schließlich wieder in einer langsam progredienten Vasokonstriktion mündet.

Des Weiteren ist die Reaktion der pulmonalen Gefäße auf generalisierte, chronische Hypoxie, die zu einem Gefäßremodelling und zur Entstehung einer PH führt und die in einem Cor pulmonale gipfeln kann, zu unterscheiden. Das Gefäßremodelling, als ein Umbau der Gefäße, kann verschiedene Komponenten haben, wie eine verstärkte Intima media und Adventitia. Darüber hinaus kann es zu einer Rarifizierung von Gefäßen kommen und zu Veränderungen in der Regulation von Membran-Rezeptoren, sowie zu einer Veränderung zellphysiologischer Mechanismen [11], [12].

1. 4 Spezifische medikamentöse Therapiemöglichkeiten der PH

adaptiert aus: [6]

Bisher bezieht sich die spezifische, nicht supportive medikamentöse Therapie der PH in der Hauptsache auf die Behandlung der pulmonalen Vasokonstriktion und der

Begleiterscheinungen der Rechtsherzhypertrophie. Neue Forschungsansätze zielen darauf ab, den Gefäßumbauprozess, der der pulmonalen Hypertonie zu Grunde liegt, rückgängig zu machen.

1. 4. 1 Prostacycline

Die Wirksamkeit des intravenös verabreichten Prostacyclins Epoprostenol (Flolan®) bei Patienten mit PH ist belegt und stellt ein Standardverfahren dar [13]. Nachteil der Therapie ist die geringe Halbwertszeit (HWZ) des Medikaments von 3-5 Minuten, die eine kontinuierliche Infusion erfordert.

Eine stabilere Variante des Prostacyclins ist das Iloprost. Iloprost hat eine HWZ von 20-30 Minuten. Es bewirkt eine Vasodilatation, die sich nahezu ausschließlich in den Lungengefäßen zeigt und deren Selektivität durch Gabe als Aerosol (Ventavis®) weiter gesteigert werden kann.

In Deutschland bisher nicht zugelassen ist das orale Prostanoid Beraprost (Dorner ®). Lediglich subkutan, jedoch nicht intravenös oder oral, ist in Deutschland Treprostinil (Remodulin®) zugelassen. Beide könnten durch ihre vorteilhafteren Applikationsmöglichkeiten die Lebensqualität Betroffener verbessern.

1. 4. 2 Endothelin- Rezeptorantagonisten

Der seit 2002 zur Verfügung stehende Endothelin (ET)-1-Rezeptorantagonist Bosentan (Tracleer®) ist oral verfügbar und wirkt pulmonal und systemisch vasodilatativ. Er blockiert die ET_A- und ET_B-Rezeptoren und verbessert das Herzminutenvolumen (HMV) ohne reflektorische Tachykardie. Eine mögliche Nebenwirkung ist unter anderem Hepatotoxizität, die aber reversibel zu sein scheint [14], [15]. Sitaxentan (Thelin™) und Ambrisentan (Volibris®) blockieren selektiv die ET_A-Rezeptoren, die an glatten Muskelzellen lokalisiert sind. Sitaxentan wurde allerdings aufgrund ausgeprägter Hepatotoxizität 2010 vom Markt genommen, die Hepatotoxizität von Ambrisentan scheint geringer ausgeprägt zu sein, wobei engmaschige Kontrollen der Leberwerte behandelter Patienten empfohlen werden.

Neu zugelassen für die pulmonale arterielle Hypertonie ist seit 2014 der duale, orale Endothelin-Rezeptor-Antagonist Macitentan (Opsumit®), welcher nach ersten Ergebnissen gute Therapierfolge aufweist und weniger hepatische Nebenwirkungen hervorruft als oben beschriebene Endothelin-Rezeptorantagonisten [16].

1. 4. 3 Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren

Der PDE 5-Inhibitor Sildenafil (Viagra®, Revatio®) ist ein Vasodilatator, der zunächst für die Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen wurde, dessen vasodilatative Wirkung jedoch auch in der Lunge nachgewiesen werden konnte [17]. Er weist aufgrund der hohen PDE 5-Expression in Lunge (und im Corpus cavernosum) eine hohe Selektivität auf. Weitere PDE 5-Inhibitoren sind Tadalafil (Levitra®) und Vardenafil (Cialis®). Nebenwirkungen einer Therapie mit PDE 5-Inhibitoren können eine Flush-Symptomatik, Kopfschmerzen und ein gestörtes Farbsehen sein.

1. 4. 4 Kalziumantagonisten

Kalziumantagonisten wie Nifedipin (Adalat®), Diltiazem (Dilzem®) und Amlodipin (Norvasc®) werden als traditionelle Vasodilatoren schon lange in der Behandlung der PAH eingesetzt. Patienten, die mit Kalziumkanalblockern behandelt werden, sollten nach 3 bis 4 Monaten einen erneuten Rechtsherzkatheter erhalten, um sicherzustellen, dass sie auf die Therapie adäquat reagieren. Grund dafür ist, dass es immer wieder Fälle gibt, in denen die Therapie keinen ausreichenden Langzeiteffekt zeigt, oder allein nicht ausreicht, auch wenn die initiale Rechtsherzkatheterisierung für eine gute Wirksamkeit eines Kalziumantagonisten im Patienten gesprochen hat. Patienten, die keine initiale Testung eines Kalziumantagonisten im Rechtsherzkatheter erhalten haben, sollten mit anderen Substanzen behandelt werden, da die Wirksamkeit dann nicht belegt ist und mit Nebenwirkungen wie z.B. Hypotonie oder Synkope zu rechnen ist. Archer et al. postulieren, dass die Ursache für den häufig eingeschränkten Langzeiteffekt von Kalziumantagonisten in einer Herunterregulierung von L-Typ Kalziumkanälen liegt, die im Verlauf der Erkrankung stattfinden könnte, sodass letztendlich nur 10% der Patienten mit einer PAH langfristig von einer Therapie mit Kalziumantagonisten profitieren [18].

1. 4. 5 Stimulator der lösliche Guanylatzyklase

2014 hat der Wirkstoff Riociguat (Adempas®) eine EU-Zulassung für die Behandlung der chronischen thrombembolischen arteriellen Hypertonie und für die Therapie der idiopathischen, der familiären und der durch Bindegewbserkrankungen verursachten pulmonalarterielle Hypertonie erhalten. Das Medikament ist bei chronischer thrombembolischer arterieller Hypertonie eingeschränkt zugelassen für nicht operable Patienten, oder bei post-operative persistierender oder rezidivierender Erkrankung.

Die lösliche Guanylatzyklase, die durch das Medikament stimuliert wird, ist ein Rezeptor von Stickstoffmonoxid (NO), sodass der Einsatz von Riociguat zu einer erhöhten Empfindlichkeit für NO führt. Riociguat kann alleine, oder bei pulmonaler arterieller Hypertonie in Kombination mit Endothelin-Rezeptorantagonisten oder Prostacyclin-Analoga verabreicht werden [19], [20].

1. 5 Regulationsmechanismen der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV)

Obwohl die HPV schon seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung ist, konnte bisher kein definitiver Sensor für die alveoläre Hypoxie und deren Übersetzung in eine Vasokonstriktion nachgewiesen werden [4].

In den bisher untersuchten Spezies wird die HPV messbar ausgelöst bei einer Hypoxie mit einem alveolaren Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von unter etwa 100mmHg [21]. Durch Denervierung, sowie Explantation von Lungen wurde bereits zu Beginn der Untersuchungen auf diesem Gebiet festgestellt, dass es sich bei der HPV um einen selbstregulatorischen Prozess der Lunge handelt, der von hormonellen und neuronalen Einflüssen prinzipiell unabhängig zu sein scheint [22], [23]. Als Effektorzellen werden die präkapillären glatten Muskelzellen von Widerstandsgefäßen am Eingang der Lungenazini angenommen [24]–[27]; im Falle der akuten Vasokonstriktion, die innerhalb von Sekunden auslösbar ist, wird diesen Muskelzellen außerdem die Rolle als Sensorzellen zugeschrieben [28]–[32]. Für Hypoxiephasen über 30 Minuten wird zusätzlich den Endothelzellen der Lunge eine Beteiligung zugerechnet [28], [33].

Zum Sensormechanismus der HPV werden unter anderem folgende Hypothesen gestellt [4]:

1. 5. 1 Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAD(P)H) -Oxidasen

NAD(P)H-Oxidasen sind Enzyme aus mehreren Untereinheiten, die in ihrem funktionellen Zustand Superoxid bilden. Sie kommen in Leukozyten vor und stellen durch die Produktion des zelltoxischen Superoxids einen Bestandteil des Immunsystems dar. Es gibt jedoch Hinweise, dass einige Isoformen des Enzyms weniger Superoxid produzieren und dieses nicht nur in den extrazellulären, sondern auch in den intrazellulären Raum abgeben können [34], [35], und dass es in der isoliert perfundierten Rattenlunge durch die Blockade der NAD(P)H-Oxidasen zu einer

Blockierung der HPV kommt [36]. Die NAD(P)H-Oxidase bietet viele mögliche Ansätze, ihre Beteiligung an der HPV zu diskutieren. Uneinigkeit herrscht bei der grundlegenden Frage, ob eine Hypoxie einen Anstieg [37] oder einen Abfall der Superoxidproduktion bewirkt [38]. Nach einer Studie von Weissmann et al. wird der NAD(P)H-Oxidase besonders eine Beteiligung in der akuten Phase der pulmonalen Vasokonstriktion zugeschrieben [9].

Zur Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies siehe weiterführend Abschnitt 1. 5. 4.

1. 5. 2 Mitochondriales Sauerstoffsensing

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Mitochondrien eine besondere Rolle als Sauerstoffsensor in der HPV übernehmen könnten: Die Mitochondrien sind nicht nur die Hauptverbraucher des Sauerstoffs in den Zellen, spezifische Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette können außerdem zu einer Verringerung der Stärke der HPV führen [32], [39], [40]. Des Weiteren zeigten die glatten Muskelzellen der pulmonalen Arterien ohne Atmungskette keine spezifische Reaktion auf eine Hypoxie [31]. Es gibt verschiedene Konzepte zu der Frage, inwieweit die Mitochondrien an der HPV beteiligt sein könnten:

1. 5. 2. 1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion und Mitochondrien

Um die Zelle mit ATP zu versorgen, wird durch verschiedene Komplexe der Atmungskette ein Protonengradient über der inneren mitochondrialen Membran aufgebaut. Die Elektronen werden in diesem Prozess entlang eines Redox-Gradienten in der Atmungskette transportiert und gelangen schließlich zu molekularem Sauerstoff, der durch sie am Komplex IV reduziert wird. Diese Elektronen können jedoch auch „akzidentiell“ auf molekularen Sauerstoff übertragen werden und somit Superoxid-Radikale bilden [4]. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass sie über einen Anionen-Kanal ins Zytosol transportiert werden können [39], [41], [42], oder von Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt durch die mitochondriale Membran ins Zytosol diffundieren und hier den HPV Signalweg modulieren können [43]. Erneut herrscht bei diesem Konzept Uneinigkeit, ob für die HPV ein Anstieg oder ein Abfall der ROS- Konzentration in den Zellen stattfinden würde.

Siehe zu diesem Abschnitt auch Kapitel 1. 5. 4.

1. 5. 2. 2 Kalzium und Mitochondrien

Die Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im Kalziumhaushalt der Zelle, da eine Potentialdifferenz zwischen der mitochondrialen und der zellulären Matrix Auswirkungen auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat [41]. Es gibt Ansätze, bei denen sich unter verschiedenen mitochondrialen Inhibitoren die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhte [44], [45]. Im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass bei der Verwendung mitochondrialer Inhibitoren die HPV abgeschwächt werden kann [21], führt dies zu der Hypothese, dass die Kalziumkonzentration über die Atmungskette Auswirkungen auf die HPV hat.

1. 5. 2. 3 Mitochondriale ATP-Produktion

Da die oxidative Phosphorylierung mit der Produktion von ATP der Hauptabnehmer von Sauerstoff in den Zellen ist, scheint es schlüssig, ATP als sekundären Botenstoff der HPV zu untersuchen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Blockierung der Atmungskette durch verschiedene Inhibitoren, als auch die Blockierung der Glykolyse zu einer Vasokonstriktion führen können [46], [47]. Auch bei diesem interessanten Ansatz zur Erklärung des Mechanismus der HPV gibt es jedoch bei zahlreichen Versuchskonstellationen unterschiedliche Ergebnisse, die sich zum Teil widersprechen. Allen gemeinsam ist die Erkenntnis, dass die verschiedenen Abbauprodukte der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung die HPV modulieren können [48]–[52].

1. 5. 3 Kalzium

Ein intrazellulärer Konzentrationsanstieg von Kalzium in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur ist ein wichtiger Bestandteil der HPV [45], [53], [54].

Einem Konzept zur Kalziumhämostase in der HPV liegt zugrunde, dass der Kalziumeinstrom in die Zelle von L-Typ Kanälen reguliert wird, die ihrerseits durch Depolarisation der Zelle aktiviert werden. Die Depolarisation käme hierbei durch Hypoxie-induzierte Inhibition spannungsabhängiger Kv-Kanäle zustande. Da jedoch verschiedene Inhibitoren von L-Typ Kalziumkanälen bisher nicht zu einer deutlichen Hemmung der HPV geführt haben, ist der Zusammenhang nicht abschließend geklärt [55]. Klar ist jedoch, dass Kv-Kanäle unter Hypoxie in den glatten pulmonalarteriellen

Muskelzellen ihre Öffnungswahrscheinlichkeit verringern und so zu Membrandepolarisation und Kalziumeinstrom führen [56], [57].

Ein weiteres Konzept fokussiert auf die Rolle von transienten Rezeptorpotential-Kationenkanälen (TRP), die eine Rolle in der Regulierung der Kalziumkonzentration in der Zelle spielen. Homozygot für den TRP-Kanal 6 (TRPC6) gendefiziente Mäuse zeigten ein Ausbleiben der akuten HPV. Die Thromboxanalogon induzierte Vasokonstriktion war jedoch in TRPC6-defizienten Mäusen unverändert, was auf eine spezifische Rolle des TRPC6 für die durch Hypoxie induzierte Vasokonstriktion schließen lässt [58].

1. 5. 4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Sowohl der Ansatz der NAD(P)H-Oxidasen, als auch der der Mitochondrien deuten letztlich auf eine Beteiligung der ROS am Sauerstoffsensormechanismus der HPV hin.

Wie unter 1. 5. 1. und 1. 5. 2. 2 bereits erwähnt ist es bisher unklar, ob ein Anstieg oder ein Abfall der ROS hierbei ausschlaggebend ist. Bei einer alveolären Hypoxie liegt ein vermindertes Sauerstoffangebot in den Zellen vor. Es käme dann folglich bei einem verminderten Angebot an Sauerstoff zur ROS Produktion. Da das Angebot an Sauerstoff in den Zellen nicht der limitierende Faktor für die ROS-Produktion sein muss, könnte ein bisher nicht identifizierter Regulationsmechanismus zu einer vermehrten ROS-Produktion führen.

Nachfolgend werden die Standpunkte im Hinblick auf ihre Zugehörigkeit zu den oben erläuterten Ansätzen beschrieben.

1. 5. 4. 1 ROS als Produkt der NAD(P)H-Oxidase

Anstieg der ROS in der HPV

Es gibt einige Studien, die Evidenz für einen Anstieg der ROS-Produktion als Faktor der HPV erbringen konnten, indem sie die NAD(P)H-Oxidase als bekannten Produzenten von ROS blockieren [37], [59]. Des Weiteren gibt es Versuche an genetisch veränderten Mäusen, deren NAD(P)H-Untereinheiten zum Teil nicht mehr funktionsfähig waren, mit dem Ziel, die Rolle der ROS-Produktion besser zu verstehen [60]–[62]. Durch diese und andere Studien lässt sich vermuten, dass Isoformen der nicht-leukozytären NAD(P)H-Oxidase als Sauerstoffsensoren der HPV gelten könnten, indem sie ihre ROS-Produktion steigern.

Abfall der ROS in der HPV

Diesem Konzept liegt zu Grunde, dass ein Absinken der ROS-Produktion durch die NAD(P)H-Oxidasen unter Hypoxie - und daher unter einem Mangel des Substrats Sauerstoff - über eine Reduktion der cGMP-Produktion zu einer Vasokonstriktion führt [38], [63]. Für diese Hypothese spricht, dass auch die NO-Freisetzung in der Lunge von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängt [64], [65] und ein Absinken der NO-Konzentration an der Guanylatzyklase zu einer verminderten Stimulation der löslichen Guanylatzyklase führt [38], [66] und eine Vasokonstriktion resultiert. Dagegen spricht jedoch, dass die Hemmung der NO-Synthese keine Vasokonstriktion in HPV-Stärke hervorruft [21].

Des Weiteren gibt es Konzepte mit der These, dass die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die in Pulmonalgefäßen im Vergleich zu glatten Koronargefäßzellen vermehrt vorkommt [67], unter hypoxischen Bedingungen mit der Glykolyse konkurriert. Da der Pentosephosphatweg in diesen Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine verstärkte Rolle im Vergleich zur Glykolyse spielen würde, könnte sich somit die ROS-Konzentration durch mangelnde Produktion absenken [66].

1. 5. 4. 2 ROS als Produkt der mitochondrialen Atmungskette

Auch im Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmungskette werden die beschriebenen gegensätzlichen Konzepte diskutiert. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der experimentellen Vorgehensweise, z.B. hinsichtlich der verwendeten Tierspezies und Dosierung der verwendeten Substanzen und in Anbetracht unterschiedlicher Messmethoden zur Bestimmung der ROS-Konzentration, sind die Ergebnisse einzelner Studien schwer miteinander zu vergleichen.

Anstieg der ROS in der HPV

Die Mehrheit der Versuche zu dieser Theorie basierte auf der selektiven Blockierung von Komplexen der Atmungskette [9], [40]. Unabhängig von der Beeinflussung der Atmungskette durch Inhibitoren konnte jedoch auch gezeigt werden, dass pulmonalarterielle glatte Muskelzellen, die keine funktionsfähige

Atmungskette besitzen, nur sehr eingeschränkt zur Produktion von ROS fähig sind und eine reduzierte Kontraktion auf Hypoxie zeigten, während sie auf Stimulation durch das Thromboxan-A₂-Mimetikum U-46619 mit einer ausgeprägten Vasokonstriktion reagierten [39], [68].

Von Paddenberg et al. ließ sich durch selektive Blockierung des Komplex II der Atmungskette durch Succinat nachweisen, dass unter hypoxischen Bedingungen zusätzlich dieser Komplex für die Produktion von ROS benötigt wird, während sich die Produktion unter normoxischen Verhältnissen auf die Komplexe I und III konzentriert. Die Blockierung des Komplex II führte unter hypoxischen Bedingungen zu einer Blockierung der ROS-Produktion, während sie unter normoxischen Bedingungen keinen Effekt verursachte [69].

Bell et al. veröffentlichten 2007 eine Studie, nach der die verlängerte Lebenszeit menschlicher pulmonaler Fibroblasten von einem durch Hypoxie induzierten Anstieg der ROS abhängt. Die Synthese mitochondrialer ROS ist für die hypoxische Aktivierung des Hypoxia-Inducible-Factors (HIF) verantwortlich. Dieser kann die reverse Telomerase-Transkriptase mRNA und die Telomerase-Aktivität induzieren, was die Lebenszeit der Zellen verlängert [70].

Abfall der ROS in der HPV

Nach diesem Konzept wird durch eine verringerte Sauerstoffkonzentration die Menge an Superoxid geringer, was die Zellen der pulmonalen Widerstandsgefäße in einen reduzierteren Zustand versetzt, Kv-Kanäle inhibiert und somit eine HPV initiiert [71].

Durch Rounds et al. wurde gezeigt, dass mitochondriale Inhibitoren den intravaskulären Druck in den Lungengefäßen unter normoxischen Bedingungen zu steigern vermögen und eine HPV verhindern können [72]. Später wurden von Archer et al. Versuche durchgeführt, aus denen hervorging, dass die Inhibierung der Atmungskette proximal der mitochondrialen ROS-Produktion an Komplex I und III das Reduktionspotential dieser Komplexe senkt, die ROS-Produktion inhibiert und einen pulmonalarteriellen Druckerhöhung verursacht [71]. Die Inhibition der Atmungskette distal dieser Komplexe hatte keine Auswirkung auf den pulmonalen Gefäßtonus [63]. Der Schluss aus dieser Beobachtung war, dass ein Absinken der ROS-Konzentration eine HPV auslösen konnte.

1. 6 Schwerpunkt dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage eines möglichen Sensors bzw. der Beteiligung von Mitochondrien an der Regulation der HPV nachgegangen. Es wurden hierzu genetisch veränderte Mäusen verwendet, deren Veränderung in einem heterozygoten Mangel an der mit D bezeichneten Untereinheit des Enzyms Succinatdehydrogenase (SDH), auch Komplex II der Atmungskette oder Ubichinon-Oxidoreduktase, bestand. Als Vergleichsgruppe wurden Tiere der gleichen Zucht verwendet, die keinen genetischen Defekt aufwiesen. Die Entwicklung von Mäusen, die einen Defekt in einem Protein der mitochondrialen Atmungskette aufweisen, bietet die Möglichkeit, ihre Bedeutung für den Sauerstoffsensormechanismus und für die Regulierung der HPV zu untersuchen ohne pharmakologische Inhibitoren einzusetzen. Die Arbeitshypothese lautete, dass eine funktionsfähige SDH eine Rolle im Sauerstoffsensormechanismus der HPV spielt.

Zusätzlich zu Versuchen unter akuter Hypoxie wurde eine Versuchsreihe zur prolongierten Hypoxie unter dreistündiger hypoxischer Ventilation durchgeführt, um die Bedeutung der voll funktionsfähigen SDH in der prolongierten Hypoxie zu untersuchen. Weitergehend wurden genetisch veränderte Tiere nach chronisch hypoxischer Haltung untersucht, die einem pulmonalen Remodelling unterlegen waren. An ihnen, sowie den normoxisch gehaltenen Vergleichstieren wurde die HPV untersucht. Somit wurden die Bedeutung einer voll funktionsfähigen SDH für die akute hypoxische Vasokonstriktion, die prolongierte Hypoxie, sowie das chronisch hypoxisch induzierte pulmonale Remodelling untersucht. In den Versuchsgruppen zur akuten hypoxischen Vasokonstriktion schlossen sich Versuche mit dem Thromboxan-A2-Mimetikum U-46619, sowie Versuche unter der Einwirkung des NO-Synthese-Inhibitors L-NNA an.

1. 6. 1 Die Succinatdehydrogenase (SDH)

1. 6. 1. 1 Schematische Darstellung der SDH

Die Succinat-Dehydrogenase (Abb.1) besteht aus vier Untereinheiten, A, B, C und D, von denen die Untereinheiten C und D in der inneren Mitochondrienmembran verankert sind, während A und B in die Mitochondrienmatrix weisen.

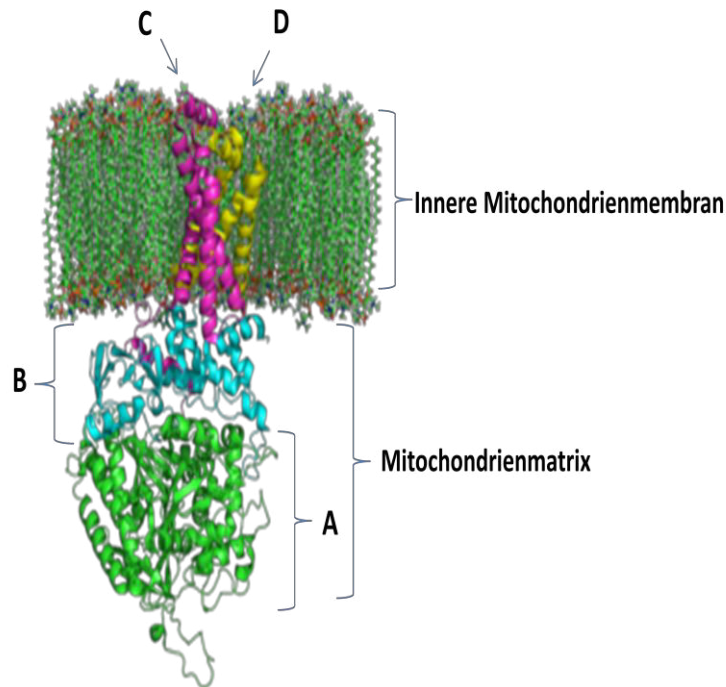


Abb. 1 Schematische Darstellung der Succinatdehydrogenase (modifiziert nach [73])

1. 6. 1. 2 Vorkommen der SDH

Das in der mitochondrialen Membran eingebundene Enzym SDH kommt im eukaryoten Organismus in Mitochondrien ubiquitär vor.

1. 6. 1. 3 Funktion der SDH

Die SDH spielt sowohl im Citratzyklus, als auch in der mitochondrialen Atmungskette eine wichtige Rolle:

- Im Citratzyklus oxidiert die SDH mit ihrer Untereinheit A Succinat zu Fumarat und reduziert dabei das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) zu FADH_2 .
- Als Komplex II in der Atmungskette reduziert die SDH unter normoxischen Bedingungen Ubichinon (Coenzym Q) zu Ubichinol. Zu diesem Zweck werden zunächst von der Untereinheit B der SDH Elektronen in Richtung der beiden membranständigen Untereinheiten C und D weitergeleitet, die anschließend zur Reduktion von Coenzym Q zu Ubichinol verwendet werden. Ubichinol wird dann in den Intramembranraum der Mitochondrien abgegeben, um von dort aus in den intramembranösen Raum zu diffundieren und in seiner Funktion als

Elektronentransporter Elektronen an Komplex III der Atmungskette weiterzugeben [74], [75].

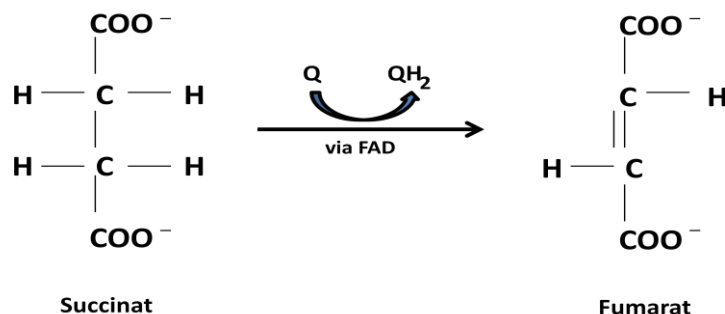


Abb. 2 Schematische Darstellung der Succinatdehydrogenase-Aktivität unter normoxischen Bedingungen (Q entspricht Coenzym Q, QH₂ entspricht Ubichinol, FAD entspricht Flavin-Adenin-Dinukleotid), (modifiziert nach [75])

1. 6. 1. 4 SDH unter hypoxischen Bedingungen

Es gibt Hinweise, dass die SDH unter hypoxischen Bedingungen ihre katalytische Aktivität umkehrt und somit als Fumarat-Reduktase arbeitet [69].

1. 6. 1. 5 Funktionsweise der SDH im Hinblick auf die HPV

Als Enzym, das sowohl in der Atmungskette, als auch im Citratzyklus der Zelle eine wichtige Rolle spielt, liegt es nahe, dass der SDH in der hypoxischen Vasokonstriktion eine Schlüsselrolle zukommt [69], [76], [77].

Redout et al. beschrieben, dass eine durch Monocrotalin induzierte PH und ein damit verbundenes Rechtsherzversagen mit einem Anstieg der Konzentration an ROS einhergeht, der von einem funktionsfähigen Komplex II der Atmungskette abhängt [78].

Im Vorfeld hatten Paddenberg et al. den SDH-abhängigen Anstieg der ROS unter hypoxischen Bedingungen, sowie die Abhängigkeit einer funktionierenden SDH für eine durch Hypoxie induzierte Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße beschrieben [69], [76]. Insbesondere die hypoxische Aktivität der SDH als Fumarat-Reduktase scheint damit für die HPV von Bedeutung zu sein, da sie als Generator von ROS unter hypoxischen Bedingungen fungiert, während unter

normoxischen Bedingungen Komplex I und III die ROS-Produktion dominieren [76]. Somit ist die Möglichkeit der Zellen, die Funktion der SDH unter hypoxischen Bedingungen im Sinne der Fumarat-Reduktase anzupassen, als wichtige Adaption an hypoxische Bedingungen zu werten [77].

Ein weiterer Aspekt der SDH im Hinblick auf die HPV ist der Zusammenhang mit α -Ketosäuren (α -KAs), die nach Studienlage nicht nur als metabolische Zwischenschritte auftreten, sondern denen auch eine Schlüsselrolle in verschiedenen zellulären Regulationsmechanismen zukommt. Zu den für die HPV wichtigen regulatorischen Aufgaben der α -KAs zählt ihr Einfluss auf die Hydroxilierung des Hypoxia-Inducible-Factors-1 α (HIF-1 α). α -Ketoglutarat ist Substrat dieser Hydroxilierung, die unter Normoxie zum Zerfall von HIF-1 α führt [79]. Pyruvat und Succinat blockieren diese Hydroxilierung (s. auch Abschnitt 1. 6. 3) [80], [81], sodass es unter hypoxischen Bedingungen zu einem Konzentrationsanstieg des HIF-1 α kommt [81]–[83].

Die Konzentration einiger α -KAs ändert sich in Herzmuskelzellen unter hypoxischen Bedingungen [84]. Des Weiteren ist nach einer Studie von Mühling et. al. die Konzentration an α -KAs in Herzmuskelzellen von Mäusen, die heterozygot gendefizient für die SDH Untereinheit D sind, bereits unter normoxischen Bedingungen reduziert. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des Komplex II der Atmungskette an der kardialen Regulation der α -KAs-Konzentration ergibt sich aus Konzentrationsunterschieden an α -KAs im rechten im Vergleich zum linken Ventrikel und dem durch Hypoxie induzierten Abfall von α -KAs in dem Herzmuskelzellen von heterozygot gendefizienten Tieren (SDHD+/-) im Vergleich zu Wildtypen [85]: rechts/linsventrikuläre Konzentrationsunterschiede und der durch Hypoxie induzierte Abfall von α -KAs waren in genetisch veränderten Tieren weniger ausgeprägt, was darauf hinweist, dass Komplex II an der Justierung der kardialen α -KAs-Konzentrationen sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Bedingungen beteiligt ist.

1. 6. 2 Das Succinat-Dehydrogenase D (SDHD)-Gen

Das SDHD-Gen kodiert für die Untereinheit D der SDH. Es befindet sich auf Chromosom 11, 11q22.3-23 [86].

1. 6. 3 Bekannte Folgen einer Mutation des SDHD-Gens beim Menschen

Als Folge einer Mutation im SDHD-Gen ist beim Menschen unter anderem das Paragangliom des Glomus caroticum bekannt. Das Glomus caroticum sitzt als Blutsauerstoffsensor an der Gabelung der Arteria carotis communis [87]–[89]. Mutationen im SDHD Gen sind für einen Teil der Erkrankungen verantwortlich. Sporadisches Auftreten des Paraganglioms, höhenabhängiges Auftreten, sowie andere Mutationen kommen ebenfalls vor [82]. Das Paragangliom des Glomus caroticum gehört zur neuronalen Gruppe der neuroendokrinen Neoplasien (Gruppe II) [90].

Zum Ausbruch der familiären Variante der Erkrankung beim Menschen kommt es, wenn bei einer heterozygoten Erbanlage das intakte Allel verloren geht (Piruat et al., 2004). Es sind verschiedene Genorte auf dem SDHD-Gen bekannt, die die Erkrankung nach sich ziehen können, der bekannteste ist D92Y [88]. Noch bevor die genetischen Grundlagen des Paraganglioms erforscht wurden war bekannt, dass die Wahrscheinlichkeit an einem Paragangliom des Glomus caroticum zu erkranken in Relation zur Höhe über dem Meeresspiegel des Lebensumfeldes liegt [92]–[94]. Die Prävalenz kann in großen Höhen im Vergleich zu Niederungen um den Faktor 50.000 steigen, die erhöhte Prävalenz suggeriert eine interessante Rolle des Sauerstoffs in der Entstehung des Paraganglioms [82]. Wie bereits unter 1. 6. 1. 5 erwähnt, haben einige Studien den zentralen Mediator der zellulären Hypoxie, den Hypoxia-Inducible-Factor-1 α (HIF-1 α) mit Defekten in der SDH in Verbindung gebracht. Es wird postuliert, dass eine so genannte Pseudohypoxie aus der Inhibierung der SDH resultiert. Diese führt dann zu einer Akkumulation von Succinat und somit durch die Inhibierung des Abbaus durch HIF-Hydroxylase aufgrund des Mangels an Sauerstoff und durch das Mehrangebot an Succinat als Endprodukt zu einer Anreicherung von HIF-1 α [81]–[83], [95].

1. 7 In dieser Arbeit verwendete Tiere

Bei den Tieren handelt es sich um genetisch veränderte (SDHD +/-) Mäuse. Die genetische Information für die SDH-Untereinheit D ist bei diesen Mäusen heterozygot ausgeschaltet (SDHD +/-) [91].

1. 7. 1 Herkunft der verwendeten Tiere

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere stammen von der Arbeitsgruppe Prof. José Lopez-Barneo, José I. Piruat et al. aus dem Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Hospital Universitario Virgen del Rocío und Centro de Producción y Experimentación Animal, Universidad de Sevilla, Spanien.

Die genetische Modifikation der Tiere sowie ihre Eigenschaften wurden 2004 von Piruat et al. beschrieben [91]. Im Folgenden sind diejenigen Punkte der Studie herausgegriffen, die für das Verständnis dieser Arbeit wichtig sind.

1. 7. 2 Genetische Eigenschaften der Tiere

Die genetische Veränderung der SDHD +/- Tiere ließ sich nur heterozygot erzeugen (SDHD +/-). Homozygot SDHD negative Mäuse (SDHD -/-) starben in utero bereits vor dem 7,5ten Tag nach der Befruchtung. In diesem Stadium befanden sich die Embryonen der Maus in der Organogenese. Die Verteilung der Genotypen der geborenen Tiere lag bei 33% genetisch unveränderten Wildtypen und 66% SDHD +/- Mäusen. Die SDHD +/- Mäuse entwickelten sich im Zeitraum von sechs Monaten ohne äußerliche Unterschiede zu den Wildtypen und waren in der Gewichtszunahme gleich [91].

1. 7. 3 Funktionelle Eigenschaften der Tiere

Um eine eventuelle Hochregulation des verbleibenden SDHD-Gens in heterozygoten SDHD +/- Mäusen auszuschließen wurde, aus Herz, Gehirn, Niere und Leber der Tiere mRNA der SDHD isoliert und quantitativ analysiert. Die Menge der mRNA war in SDHD +/- Tieren reduziert. Des Weiteren wurde in den Geweben die Aktivität der SDH bestimmt, die im Vergleich zwischen SDHD +/- und Wildtyp Tieren etwa halb so groß war, während die Aktivität des Komplex I der Atmungskette unverändert blieb [91].

1. 7. 4 Glomus caroticum-Eigenschaften der Tiere

An einzelnen Glomus caroticum Zellen in Schnitten des gesamten Organs konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der aus SDHD +/- Tieren stammenden Zellen auf Hypoxie geringfügig höher war als die vergleichbarer Wildtyp Zellen. Gemessen wurde hierbei die Katecholaminausschüttung. Piruat et al. führen diesen Effekt darauf zurück, dass die SDHD +/- Zellen unter normoxischen Bedingungen eine signifikant höhere Spontanaktivität hatten. Da diese höhere Spontanaktivität durch die Blockade von

Kalziumkanälen zu vermeiden war, kann die Aktivität auf einen extrazellulären Kalziumeinstrom zurückgeführt werden [91].

In der patch-clamp Technik wurde besonderes Augenmerk auf die Funktion der Kaliumkanäle der Zellen des Glomus caroticum der Tiere gelegt. Während genetisch unveränderte Zellen auf eine Membrandepolarisation mit einem Kaliumeinstrom reagierten, der sich bei starker Depolarisation einer Sättigung annäherte, war der Bezug zwischen Membrandepolarisation und Kaliumeinstrom bei SDHD +/- Tieren nahezu linear. Das Verhalten der genetisch unveränderten Zellen spiegelt die Abhängigkeit der Kaliumkanäle von Membranpotential und Kalziumkonzentration in den Zellen wider, da sich die Sättigung nahe dem Kalziumgleichgewichtspotential befindet. Da sich die SDHD +/- Zellen in dieser Hinsicht anders verhalten, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass die Sensitivität der Kaliumkanäle hier gegenüber Kalzium vermindert ist [91]. An den SDHD +/- Tieren selber konnten keine Paragangliome des Glomus caroticum nachgewiesen werden. Beim Menschen bricht die Erkrankung dann aus, wenn das intakte Allel des SDHD- Gens ausgeschaltet wird, was bei den Mäusen nicht der Fall war. José I. Piruat et al. geben hier unter anderem als Ursache zu bedenken, dass die Tiere möglicherweise nicht das Alter erreichen, indem es zum Zugrundegehen des intakten Allels kommt [91].

2. Material und Methoden

2. 1 Versuchstiere

SDHD +/- Tiere und SDHD Wildtyp Mäuse.

2. 1. 1 Herkunft

Die ursprünglichen acht Tiere stammten von der Arbeitsgruppe José López-Barneo aus dem Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Hospital Universitario Virgen del Rocío und Centro de Producción y Experimentación Animal, Universidad de Sevilla, Spanien [91].

2. 1. 2 Herstellung der genetischen Veränderung

Die Züchtung der verwendeten Tiere wurde von José I. Piruat et al. beschrieben [91].

2. 1. 3 Nachzucht und Haltung

Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere wurden im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität gezüchtet. Als Zuchtpaare diente hierbei stets ein weibliches SDHD +/- Tier und ein männliches WildtypTier. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Wasser und dem Standardfuttermittel Altromin®. Die Raumtemperatur lag bei etwa 25°C, die Beleuchtungsdauer bei 12h/d.

2. 1. 4 Haltung der Mäuse in Hypoxie-und Normoxiekammern

Für einige Versuche der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse zur Induktion einer pulmonalen Hypertonie unter chronischer Hypoxie gehalten. Hierzu wurden sie in speziellen Kammern normobar bei 10% O₂ gehalten; die Kontrolltiere wurden normobar bei 21% O₂ gehalten. Die Haltungsbedingungen entsprachen den unter 2. 1. 3 beschriebenen. Die entsprechende Gaskonzentration wurde durch kontinuierliche Messung garantiert.

2. 1. 5 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung der verwendeten Mäuse wurde freundlicherweise von Dr. Uwe Pfeil vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen durchgeführt.

2. 2 Tierversuchsgenehmigungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen als anzeigepflichtige Tierversuche unter folgenden Titeln genehmigt:

- 1) Pathomechanismus der resp. Insuffizienz, Aktenzeichen GI 20/10 (Anzeige vom 16.10.2003)
- 2) Pathomechanismus der resp. Insuffizienz, Aktenzeichen GI 20/10 (Anzeige vom 15.3.2006)
- 3) Pathomechanismen der alveolären Hypoxie, Aktenzeichen GI 20/10, Nr. A 28/2009
- 4) Pathomechanismus von Lungenfunktionsstörungen am Mausmodell, Aktenzeichen GI 20/10 (Anzeige vom 18.06.2008)
- 5) Die pathologischen und molekularbiologischen Mechanismen am Mausmodell der alveolären Hypoxie, Aktenzeichen GI 20/10, Nr. A 34/2011

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen als genehmigungspflichtige Tierversuche unter folgenden Titeln genehmigt:

- 1) SDHD bei pulmonaler Hypertonie, Aktenzeichen GI 20/10, Nr. 44/2009
- 2) Genregulation des reversiblen pulmonalen Gefäßremodellings, Aktenzeichen GI 20/10, Nr. 34/2006

2. 3 Materialien

2. 3. 1 Geräte

- Peristaltische Infusionspumpe: Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Beatmungspumpe: Hugo Sachs Elektronik MiniVent Type 845, March-Hugstetten, Deutschland
- Wägezelle: Kent Scientific Corporation Isometric Transducer
- Verstärker: 1) World Precision Instruments, Transbridge 4M

2) Transducer Amplifier Module, Hugo Sachs Elektronik, March-
Hugstetten, Deutschland

- Druckaufnehmer: Combitrans® 1fach Set, Modell II Uni Gießen, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Kühlung: Frigomix® U-1, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Temperaturregulator: Thermomix®, B Braun, Melsungen, Deutschland
- pH-Meter: Radiometer ABL 500, Block Scientific, New York, USA
- Gasdruckmesser: Aalborg 1-800-866-3837, Orangeburg, New York, USA
- Handelsübliche Waage für Messgrößen im Bereich bis 500g
- Zentrifuge: Adams Autocrit TM Centrifuge, Clay Adams, Parsippany, N.J., USA
- Computer mit Monitor
- Grafik- und Datenerfassungsprogramm Labtech Notebook Pro, ©1994 Laboratory Technologies Corp., Wilmington, USA
- Software „Pulmodyn“ (Version 1.0.16.9, Ingenieurbüro Peter Kegel und Sigrid Guhr, Gross-Zimmern, Deutschland)

2. 3. 2 Verbrauchsmaterialien

- chirurgischer Faden: 5-0 Ethibond Excel, Johnson&Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA
- Dreiwegehahn: Dicofix®, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Einmalhandschuhe: Transaflex® Ansell, Surbiton Surrey, UK
- Einmalspritzen 1ml, 2ml, Inject Luer®, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Perfusor-Leitung 150cm, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Zellulose Unterlagen, Tork, Mannheim, Deutschland
- Zellstofftupfer 5x4cm, Purzellin®, Lohmann und Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
- Mulltupfer, pflaumengroß, Beese, Barbüttel, Deutschland
- Combi-Stopper, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Medizinisches Klebeband, Durapore®, 3M, St. Paul, MN, USA
- Hämatokrit-Kapillaren, 77mm/60µl, D.A. 1,3-1,4mm, Na- Heparin, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

- Silikonspray, Centramed Medizintechnik, Koblenz, Deutschland
- Kanülen in verschiedenen Stärken: BD Microlance TM, Drogheda, Ireland

2. 3. 3 Präparationsmaterialien

- Trachealtubus aus einer Einmalkanüle 1,2x4,0mm (gekürzt auf 1,3cm und abgestumpft), BD Microlance TM, Drogheda, Ireland
- Präparationsbesteck: Pinzette gebogen, Pinzette gerade, Mikro-Schere, Schere, Firma F.S.T., Heidelberg, Deutschland
- handelsübliche Korkplatten
- handelsübliche Stecknadeln
- Befestigung und Fixierung der Katheter: Miniball mit 8mm Threaded M2 Rod, T50034 und zwei Miniball Joint Holder T32045, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Katheter zum Einführen in den linken Ventrikel: Eigenanfertigung, in Form eines Angelhakens gebogenes, ca. 3cm langes, hohles Metallstück mit ca. 1,2mm Durchmesser und einer Verdickung am gebogenen Ende

2. 3. 4 Pharmaka, Chemikalien und Gase

- Krebs–Henseleit Perfusat (120mmol NaCl, 4,3mmol KCl, 1,1mmol KH₂PO₄, 2,4mmol CaCl₂, 1,3mmol MgCl₂, 13,3mmol Glucose 5%, 5% (w/v) Hydroxyethylamylopectin mit einem Molekulargewicht von 200000), Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat 1molar 8,4%, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
- Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) 100mg/ml, Parke-Davis, Berlin, Deutschland
- Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2%, Bayer Healthcare, Deutschland
- Isotonische NaCl-Lösung 0,9%, DeltaSelect, München, Deutschland
- Heparin-Natrium-25.000, Ratiopharm, Ulm, Deutschland
- Proteinlöser PAL 50, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Aqua ad iniectabilia, Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland
- L-NNA: N ω -Nitro-L-Arginine, EC No 218-418-9, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- U46619, PG-023, Paesel und Lorei GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck, Darmstadt, Deutschland

- Normoxiegas: 21% O₂, 5,3 % CO₂ abgeglichen mit N₂, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland
- Hypoxiegas: 1% O₂, 5,3% CO₂ abgeglichen mit N₂, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland

2. 3. 5 Materialien für die Histologie

2. 3. 5. 1 Allgemeine Materialien

- Ethanol 17%, 95%, 99,6%, vergällt mit Ethylmethylketon, Fischer, Saarbrücken, Deutschland
- Isopropanol 99,8%, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Methanol reinst, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Wasserstoffperoxid 30% pro analysis, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Roti-Histol (Xylolersatz), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Xylol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Deckgläser 24x36mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Universal-Einbettkassetten mit Deckel, verschiedenfarbig, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträger, Superfrost Plus®, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Mikrotomklingen S 35, Feather, Japan (über: Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland)
- Paraffin Einbettmedium, Paraplast Plus®, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Eindeckmedium Xylol-löslich, Pertex®, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
- Trypsin, Digest All 2®, Zytomed, Berlin, Deutschland
- Avidin-Biotin-Blocking Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Normal Goat Serum, Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
- Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit-IgG), Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Vector VIP Substrat Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- DAB Substrat Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Methylgrün Counterstain, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland

2. 3. 5. 2 Antikörper

- Anti-von-Willebrand-Faktor: Rabbit IgG (in einer Verdünnung von 1: 900 mit 10% BSA), Vectastain, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Anti- α -smooth-muscle-Actin: M.O.M. Kit, PK2200 (in einer Verdünnung von 1: 900 mit 10% BSA), Vector, Burlingame, UK

2. 3. 5. 3 Zambonis Fixativ

- 0,2M Na₂HPO₄: 390ml
- 0,2M NaH₂PO₄: 110ml
- 16% Paraformaldehyd: 25ml
- Saturated Picric Acid: 15ml
- Aqua dest.: 10ml

Das Fixativ wurde titriert auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 [96].

2. 3. 5. 4 Geräte

- Rotationsmikrotom vollautomatisch, RM 2165, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträgerstrecktisch, HI 1220, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Paraffinstreckbad, HI 1210, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Paraffinausgießstation, EG 1140H, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Kühlplatte, EG 1150C, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Stereomikroskop Durchlicht, DMLA, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Digitale Kamera, DC 300F, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Computer Q550 IW, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Software, Q Win V3, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Makros für Muskularisierungsgrad, speziell entwickelt von Informatiker C. Frank, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

2. 4 Das Modell der isolierten Mauslunge

2. 4. 1 Einführung

Bereits 1912 beschrieben Knowlton und Starling eine frühe Version des Modells des isolierten Kaninchenherzens [97]. Seit 1993 wird ein modifiziertes Modell an der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet [98]. 2004 wurde das Modell dort auch für die isolierte Mauslunge etabliert [99]. Es bietet die Möglichkeit, unabhängig vom zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einfluss des Gesamtorganismus am intakten, blutfreien, ventilierten und perfundierten Organ, Daten zu erheben und Perfusat und Atemgas zu entnehmen. Unter anderem durch die kontinuierliche und direkte Erfassung des pulmonalarteriellen Drucks in Kombination mit der Möglichkeit die Zusammensetzung des Beatmungsgases, sowie die Zusammensetzung der Perfusionsflüssigkeit zu modulieren, ermöglicht es die Untersuchung von komplexen Fragestellungen. Es können physiologische Zustände untersucht und pathologische Zustände induziert werden.

2. 4. 2 Versuchsaufbau

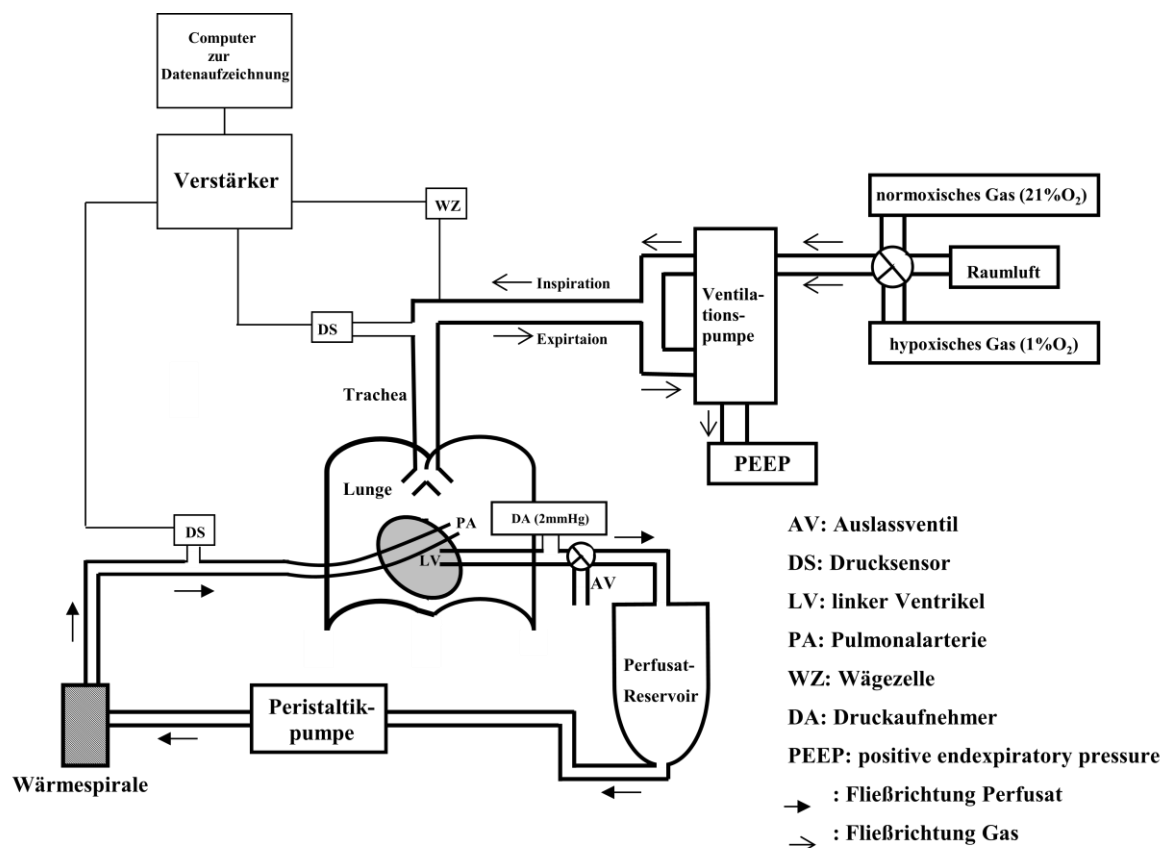


Abb. 3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Modell der isoliert perfundierten Lunge

Die Lungen wurden in einer beheizten und befeuchteten Kammer an einer Wägezelle frei aufgehängt. Sie wurden von einer peristaltischen Perfusionspumpe in einem geschlossenen System gefäßseitig perfundiert. Als Perfusat diente hierbei Krebs-Henseleit Perfusat, das mit Hilfe von Natriumbicarbonat (2,4 ml Natriumbicarbonat/ 100ml Perfusat) und durch die Begasung mit CO₂-haltigem Gas auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 eingestellt wurde. Die Perfusionsrate betrug 2ml/min.

Die Ventilationsparameter während des Versuches waren folgendermaßen festgelegt: 250µl/Atemzug bei 90 Atemzügen/min mit normoxischem (21% O₂) oder hypoxischem (1% oder 3% O₂) Gas. Der positive endexpiratorische Druck betrug 3cm Wassersäule.

Um eine konstante Temperatur des Perfusats und des Gewebes von 37°C zu garantieren, wurden der Vorratsbehälter des Perfusats und die Kammer, die die Lunge umgab, ständig mit 37°C warmem Wasser beheizt. Zusätzlich wurde das Perfusat durch eine Heizspirale geleitet. Luftembolien wurden durch sorgfältiges Entlüften des Schlauchsystems vor Beginn der Präparation ausgeschlossen.

2. 4. 3 Instandhaltung des Systems

Vor Beginn eines Versuchs wurde das gesamte System zunächst mit 80ml destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden alle Schläuche bis auf jene, die zu den flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmern führten, mit 20ml Perfusat gespült.

Nach Abschluss jedes Versuchs wurde das System zunächst mit mindestens 50ml destilliertem Wasser und anschließend mit 0,1ml des Proteinlösers PAL 50 (Carl-Roth, Karlsruhe) in 20ml destilliertem Wasser ausgespült. Bis zur nächsten Verwendung des Systems verblieb der Proteinlöser in seiner Verdünnung im Schlauchsystem. Der Teil des Schlauchsystems, der über die Perfusatpumpe verlief, wurde zur Schonung des Materials mit Silikonspray eingesprüht.

2. 4. 4 Präparation der Mauslunge

Die Präparation ließ sich in drei Abschnitte unterteilen:

- 1) Anästhesie, Muskelrelaxation und Antikoagulation
- 2) Intubation
- 3) Perfusion und Präparation der Lunge

2. 4. 4. 1 Anästhesie, Muskelrelaxation und Antikoagulation

Zunächst wurde die Maus anästhesiert mit einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid in einer Dosierung von 40-160 mg/kg Körpergewicht und Xylazinhydrochlorid in einer Dosierung von 8-32 mg/kg Körpergewicht, verdünnt durch physiologische Kochsalzlösung auf ein Volumen von 50-200µl. Die Applikation erfolgte i.p. Eine Antikoagulation wurde erreicht durch die Injektion von 1000U/kg Heparin i.v. unter Narkose.

2. 4. 4. 2 Intubation

In tiefer Narkose wurde die Maus nun auf einer Korkplatte an den beiden Vorderläufen fixiert. Die Korkplatte befand sich hierbei senkrecht auf der Hebebühne, so dass ihre Höhe flexibel war. Der Thorax wurde mit destilliertem Wasser befeuchtet, um Fellreste im Präparationsgebiet zu vermeiden. Nun wurde der Maus mit einer Schere ein ca. 4mm breiter Hautlappen vom kaudalen Ende des Sternums bis unter das Kinn entfernt. Die über der Luftröhre befindlichen Speicheldrüsen wurden stumpf abgelöst. Die Trachea wurde stumpf mit einer

gebogenen Pinzette unterfahren und ein Bindfaden unter ihr platziert. Ein Knoten wurde über der Trachea vorgelegt. Durch eine Tracheotomie kurz unterhalb des Kehlkopfes wurde die Maus intubiert und über die Beatmungspumpe mit Raumluft beatmet. Das Beatmungsvolumen lag zunächst bei 150µl/Atemzug, bei 90 Atemzügen/min, 50% Inspirationszeit und 3cm Wassersäule positivem endexpiratorischem Druck (PEEP). Der vorgelegte Knoten wurde zugezogen und die Kanüle zur Beatmung so fixiert.

2. 4. 4. 3 Perfusion und Präparation der Lunge

Jetzt erfolgte eine waagerechte Oberbauchlaparotomie durch eine Schnittführung unterhalb der Rippenbögen in den Bereich der Flanken hinein. Der Processus xyphoideus wurde nach oben gezogen, um freie Sicht auf das Zwerchfell zu gewährleisten. Dieses wurde dann stumpf abgelöst und somit ein Pneumothorax erzeugt, woraufhin die Lunge kollabierte. Jetzt konnte das Diaphragma zu beiden Seiten aufgeschnitten werden, ohne dass die Lunge Schaden nahm. Anschließend wurde der Thorax durch einen mediosternalen Schnitt komplett eröffnet und zu beiden Seiten der Maus durch Nadeln auf der Korkplatte befestigt. Der Thymus wurde stumpf entfernt und gab den Blick auf das Herz frei. Durch den spitzen, geschlossenen Einsatz einer kleinen Schere wurde der linke Ventrikel im Bereich der Herzspitze mit einem Loch versehen. Die Pulmonalarterien und die Aorta wurden zusammen mit einer gebogenen Pinzette mit einem chirurgischen Faden unterfahren. Ein Knoten wurde vorgelegt. Durch einen Einschnitt konnte nun ein Katheter in die Pulmonalarterie eingeführt und dort mit Hilfe des vorgelegten Fadens eingebunden werden. Dabei wurde auch die Aorta abgebunden, was zum Tod des Tieres führte¹.

Von diesem Zeitpunkt an erfolgte somit die Perfusion der Lunge. Das Perfusat wurde bis zur Einführung des Abflusskatheters in regelmäßigen Abständen durch die in den linken Ventrikel gesetzte Austrittsöffnung zum Abfluss gebracht, so dass es nicht zu einer Stauung kommen konnte. Die Perfusionsrate betrug zu diesem Zeitpunkt 0,2ml/min bei einer Temperatur des Perfusats von 4°C. Zeitgleich mit dem Anschließen des Perfusats wurde die Beatmung von Raumluft auf die Beatmung mit dem normoxischen Gasgemisch umgestellt.

¹ Die Durchführung der Experimente bis zur Tiertötung wurde nicht selber vorgenommen.

Der nächste Schritt bestand im Herauspräparieren der Lunge, ohne das Gewebe dabei durch Berührung mit den Instrumenten zu beschädigen. Die Lunge war jetzt nur noch über den Trachealtubus frei an der Wägezelle hängend befestigt. Anschließend wurde in den linken Ventrikel der ableitende Katheter eingeführt, der Druck im linken Ventrikel durch den flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer registriert und auf 2mmHg fixiert. Jetzt wurde begonnen, die Lunge mit 20ml Perfusat auszuspülen. Das Effluat wurde verworfen.

2. 4. 5 Aufwärmphase

Während des Spülens wurde die Perfusionsrate langsam auf einen Zielwert von 2ml/min erhöht, das Atemvolumen wurde auf 250 μ l/Atemzug gesteigert und das Perfusat auf 37°C erwärmt. Nachdem alle Zielwerte erreicht waren, wurde das System rezirkulierend mit einem Volumen von 13ml Perfusat betrieben und die Lunge von einem ebenfalls auf 37°C erwärmten und befeuchteten Glasbehälter umgeben.

Die Präparation dauerte im Durchschnitt 20 Minuten, die Spülung und das Hochfahren des Systems auf die gewünschten Werte nahmen ca. 20 weitere Minuten in Anspruch.

2. 4. 6 Aufzeichnung

Nach Kalibrierung der Druckaufnehmer wurde das von ihnen erzeugte analoge Signal verstärkt und mit Hilfe einer A/D-Wandlerkarte in einem PC mit Hilfe der Software „Pulmodyn“ in ein digitales Signal umgewandelt. Aufgezeichnet wurden der linksventrikuläre und der pulmonalarterielle Druck, sowie der Beatmungsdruck und Veränderungen des Lungengewichts.

2. 4. 7 Ausgangsbedingungen

Am Anfang jedes Versuchs stand eine Ventilations- und Perfusionsphase von 15 Minuten zur Adaption des Organs an das Versuchssystem. Der pulmonalarterielle Druck, der linksventrikuläre Druck, der Ventilationsdruck und das Lungengewicht sollten während dieser Zeit konstant sein. War dies nicht der Fall, konnte die Lunge nicht für die Experimente verwendet werden.

Bedingungen für den weiteren Versuch waren darüber hinaus:

- 1) eine homogene, weiße Oberfläche der Lunge
- 2) keine Zeichen eines Ödems oder von Atelektasen
- 3) ein normoxischer, pulmonalarterieller Druck von etwa 6mmHg.

2. 4. 8 Verwendung von U-46619 und N ω -Nitro-L-Arginine (L-NNA)

2. 4. 8. 1 U-46619

Bei der Substanz U-46619 handelt es sich um ein Thromboxan-A₂-Mimetikum. Thromboxan-A₂ bewirkt an seinem G-Protein gekoppelten membranständigen Rezeptor

eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Substanz U-46619 ist als Standardverfahren zur Induktion einer pulmonalen Vasokonstriktion etabliert [65], [100]–[102].

2. 4. 8. 2 N ω -Nitro-L-Arginine (L-NNA)

L-NNA ist ein Hemmer der NO-Synthese und vermindert somit die Vasodilatationspotenz der Lunge. Es handelt sich um einen kompetitiven Hemmer der NO-Synthetase. Die Verwendung von NO-Synthetase-Inhibitoren ist als Verfahren zur Inhibition der NO-Synthese im Modell der isoliert perfundierten Lunge etabliert [64], [65].

2. 5 Versuchsabläufe an der isoliert perfundierten Lunge

2. 5. 1 Adaptionphase

Auf die Aufwärmphase folgte bei allen Versuchen eine Adaptionphase von 15 Minuten, in denen alle Parameter unter Normoxie gleich blieben. Vergleiche auch Kapitel 2. 4. 7.

2. 5. 2 Umstellung zwischen Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (1% O₂)

Die Umstellung von normoxischer (21% O₂) auf hypoxische Beatmung (1% O₂) erfolgte durch ein Ventil, das die entsprechende Gaszufuhr zu der Beatmungspumpe regelte.

2. 5. 3 Überblick über die Versuche unter akuter hypoxischer Ventilation und U-46619-induzierter Vasokonstriktion mit und ohne Gegenwart von L-NNA

Die Versuche zur akuten hypoxischen Ventilation (2. 5. 4), zur Verwendung von U-46619 (2. 5. 5), zur hypoxischen Ventilation unter Verwendung von L-NNA (2. 5. 6) und zur Verwendung von L-NNA und Zugabe von U-46619 (2. 5. 7) erfolgten frequentiell. Eine Gesamtübersicht gibt Abb. 4, Einzeldarstellungen finden sich jeweils in den Versuchsbeschreibungen. Die U-46619-Verabreichung erfolgte jeweils als Bolus, die Substanz wurde anschließend aus dem Perfusat ausgeleitet und verblieb somit nicht im System (2. 5. 5).

Versuchsgruppen:

- 5 normoxisch gehaltene Wildtypen (21% O₂) (2. 1. 4)
- 5 normoxisch gehaltene SDHD +/- Tiere (21% O₂) (2. 1. 4)
- 6 Wildtypen, die 3 Wochen in chronischer Hypoxie (10% O₂) gehalten wurden (2. 1. 4)
- 6 SDHD +/- Tiere, die 3 Wochen in chronischer Hypoxie (10% O₂) gehalten wurden (2. 1. 4)

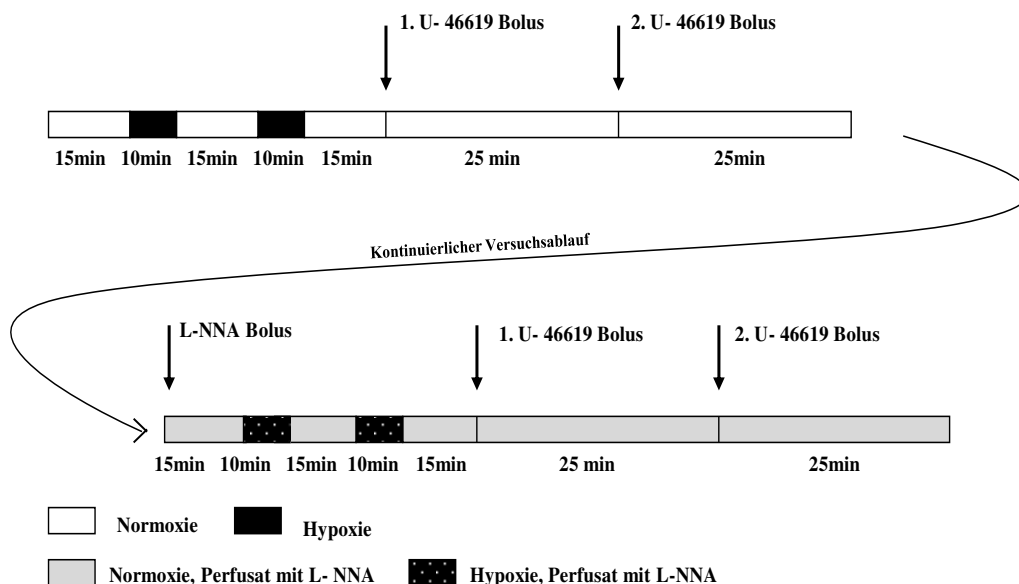


Abb. 4 Versuchsablauf der akuten hypoxischen Ventilation, sowie der im Anschluss erfolgten Versuche mit U-46619. Dann Zugabe von L-NNA und erneute akute hypoxische Ventilation, sowie Gabe von U-46619 unter Einwirkung von L-NNA.

2. 5. 4 Akute hypoxische Ventilation

Nach Aufwärmphase und Anpassungsphase wurden die Lungen zunächst für 15 Minuten normoxisch (21% O₂), dann für zehn Minuten hypoxisch (1% O₂) ventiliert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und durch eine weitere 15-minütige Normoxiephase abgeschlossen.

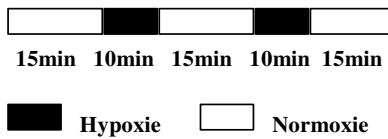


Abb. 5 Versuchsablauf der akuten hypoxischen Ventilation

2. 5. 5 Versuche mit U-46619

Die Versuche erfolgten im Anschluss an die Versuche für die akute Hypoxie (2. 5. 4); die Versuchsgruppen blieben gleich.

2. 5. 5. 1 Verdünnung und Zugabe von U-46619

Das im Verhältnis 2:1 in DMSO gelöste U-46619 wurde mit Perfusionsmedium verdünnt und in einem Volumen von 1ml über einen Bypass direkt der A. pulmonalis zugeführt. Im Perfusat wurde eine Konzentration von 1,5nM U-46619 erreicht.

Für den Zeitraum unmittelbar nach der Applikation wurde das System hinter der Lunge unterbrochen, so dass die Substanz nach Verlassen der pulmonalen Strombahn nicht in das Reservoir für Perfusat gelangte, sondern das System verließ. Es wurde ein Volumen von 1ml ausgeleitet, sodass die Perfusatmenge unverändert blieb.

2. 5. 5. 2 Versuchsablauf

Nach 15-minütiger Normoxiephase wurde dem System ein U-46619-Bolus zugeführt, der sodann die Lunge einmal durchlief, bevor er wieder ausgeleitet wurde. Ein weiterer Bolus wurde 40 Minuten nach Versuchsbeginn auf die gleiche Weise eingebracht und wieder ausgeleitet.

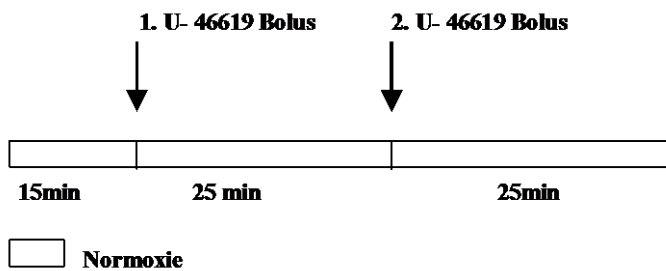


Abb. 6 Versuchsablauf unter Normoxie und Zugabe von U-46619

2. 5. 6 Versuche zu akuter hypoxischer Beatmung in Gegenwart von L-NNA

Die Versuche erfolgten im Anschluss an die hypoxische Ventilation (2. 5. 4) und die U-46619 Applikation (2. 5. 5); die Versuchsgruppen blieben die Gleichen.

2. 5. 6. 1 Verdünnung und Zugabe von L-NNA

Nach Herstellung einer einmolaren Stammlösung (2,192mg L-NNA/ 10ml Perfusat) wurde aus dieser Stammlösung durch Einpipettieren in das Reservoir L-NNA in das Perfusat gegeben, so dass im Perfusat eine Konzentration von 400µM resultierte. Die Perfusatmenge blieb unverändert.

2. 5. 6. 2 Versuchsablauf

L-NNA wurde 15 Minuten vor einer 10-minütigen hypoxischen Ventilationsphase appliziert. Nach weiteren 15 Minuten der normoxischen Beatmung schloss sich erneut eine 10 minütige Hypoxiephase an, auf die dann 15 Minuten normoxische Beatmung folgten.

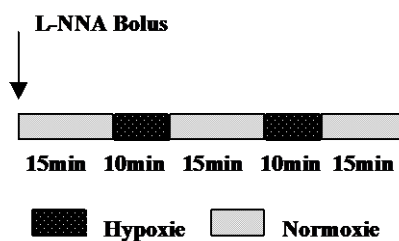


Abb. 7 Versuchsablauf unter wechselnder Normoxie und Hypoxie in Gegenwart von L-NNA

2. 5. 7 Versuche in Gegenwart von L-NNA und unter Zugabe von U-46619

Die Versuche erfolgten im Anschluss an die Versuche mit akuter hypoxischer Ventilation (2. 5. 4), die Applikation des Thromboxan-Analogons (2. 5. 5) und akuter Hypoxie in Gegenwart von L-NNA (2. 5. 6); die Versuchsgruppen blieben die Gleichen.

2. 5. 7. 1 Zugabe von U-46619

Da für die Versuche die gleichen Mausungen benutzt wurden wie für die vorangegangenen, befand sich L-NNA bereits im Perfusat (2. 5. 6. 1). U-46619 wurde entsprechend der unter 2. 5. 5 beschriebenen Versuche verdünnt und substituiert, sowie wieder ausgeleitet.

2. 5. 7. 2 Versuchsablauf

U-46619 wurde nach 15min appliziert und wieder ausgeleitet. Ein zweiter U-46619 Bolus wurde nach weiteren 25min normoxischer Beatmung appliziert.

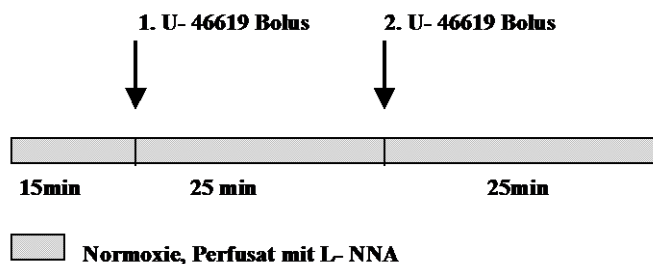


Abb. 8 Versuchsablauf unter Normoxie bei Zugabe von U-46619 in Gegenwart von L-NNA

2. 5. 8 Dreistündige Hypoxie

Die Versuchsgruppen bestanden aus 6 SDHD +/- Tieren und 6 Wildtypen.

Nach Aufwärmphase und Adaptionphase erfolgte der Versuchsablauf folgendermaßen: Es wurde zunächst über 15 Minuten eine Beatmung mit normoxischem Gas hypoxischem (21% O₂), darauf eine 10-minütige Hypoxiephase (1% O₂), dann wieder eine 15-minütige normoxische Ventilation durchgeführt. Nun schlossen sich drei Stunden hypoxische Ventilation an, auf die wiederum drei 15-minütigen Normoxiephasen im Wechsel mit zwei 10-minütigen Hypoxiephasen folgten.



Abb. 9 Versuchsablauf unter prolongierter, dreistündiger Hypoxie

2. 5. 9 Dreistündige Normoxie

Die Versuchsgruppen bestanden aus 5 SDHD +/- Tieren und 5 Wildtypen.

Zum Vergleich zur Hypoxiegruppe wurden die Lungen der Tiere hier für drei Stunden mit normoxischem Gas beatmet. In Analogie zu den Hypoxie-Versuchen lag die gesamte normoxische Beatmung bei 285min.

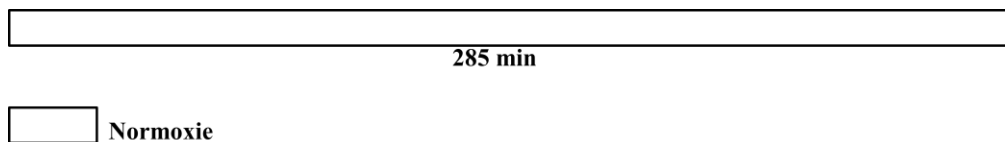


Abb. 10 Versuchsablauf der dreistündigen Normoxie

2. 6 Hypoxieinduzierte pulmonale Hypertonie bei SDHD+/- und Wildtypmäusen

In diesen Versuchen galt das Interesse in erster Linie der in den Mäusen durch langfristige Hypoxie (3 Wochen in Hypoxiekammer, 10% O₂) ausgelösten pulmonalen Hypertonie. Es handelte sich um neue Versuchstiere. Die Versuchsgruppen setzten sich wie folgt zusammen:

- 5 normoxisch gehaltene Wildtypen (21% O₂) (2. 1. 4)
- 6 normoxisch gehaltene SDHD +/- Tiere (21% O₂) (2. 1. 4)
- 6 Wildtypen nach 3 Wochen Haltung unter hypoxischen Bedingungen (10% O₂) (2. 1. 4)
- 5 SDHD +/- Tiere nach 3 Wochen Haltung unter hypoxischen Bedingungen (10% O₂) (2. 1. 4)

2. 6. 1 Wiegen der Mäuse

Nach drei Wochen in der normobaren Hypoxiekammer mit 10% Sauerstoff, beziehungsweise nach drei Wochen in normobaren Normoxiekammern mit 21% Sauerstoff, wurden die Tiere auf einer handelsüblichen Waage gewogen.

2. 6. 2 Messung des Drucks im rechten Ventrikel

Nach drei Wochen in der Hypoxie- bzw. Normoxiekammer wurde der Druck im rechten Ventrikel der Mäuse gemessen.

Die Druckmessung ließ sich in folgende Schritte unterteilen:

- a) Narkose, Muskelrelaxation, Antikoagulation
- b) Beatmung
- c) Präparation des rechten Ventrikels und Einbringen der Messkanüle
- d) Messung des rechtsventrikulären Drucks

2. 6. 2. 1 Narkose, Muskelrelaxation, Antikoagulation

Zunächst wurde die Maus anästhesiert mit einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid in einer Dosierung von 40-160 mg/kg Körpergewicht und Xylazinhydrochlorid in einer Dosierung von 8-32 mg/kg Körpergewicht, verdünnt durch physiologische Kochsalzlösung auf ein Volumen von 50-200µl. Die Applikation erfolgte i.p. Eine Antikoagulation wurde erreicht durch die Injektion von 1000U/kg Heparin i.v. unter Narkose.

2. 6. 2. 2 Beatmung

Der auf einer liegenden Korkplatte fixierten Maus wurde das Fell des Thorax mit destilliertem Wasser befeuchtet und mit einer Schere ein ca. 4mm breiter und 8mm langer Hautlappen über der Trachea entfernt. Die Speicheldrüsen wurden stumpf zur Seite geschoben. Die Trachea wurde mit einer gebogenen Pinzette unterfahren und mit einem Faden ein Knoten vorgelegt. Durch eine Tracheotomie kurz unterhalb des Kehlkopfes wurde die Maus intubiert und über die Beatmungspumpe mit normoxischem Gas beatmet. Das Beatmungsvolumen lag hierbei bei 250µl/Atemzug, bei 90 Atemzügen/min, 50% Inspirationszeit und einem PEEP von 3cm Wassersäule. Der Tubus wurde mit einem Knoten fixiert.

2. 6. 2. 3 Präparation des rechten Ventrikels und Einbringen der Messkanüle

Unterhalb des Sternums wurde die Haut der Maus auf ca. 5x5mm entfernt und die Bauchdecke zu beiden Seiten ca. 7mm eingeschnitten. Durch die entstandene Öffnung wurde stumpf das Diaphragma eröffnet. Es entstand ein Pneumothorax und

die Sicht auf das Herz wurde frei. Durch die Wand des rechten Ventrikels wurde eine Kanüle im Inneren des Ventrikels platziert.

2. 6. 2. 4 Messung des rechtsventrikulären Drucks

Die nun im Ventrikel befindliche Kanüle wurde mit 0,1-0,2ml 0,9% NaCl gespült. Nach Kalibrierung des auf Herzhöhe angebrachten Druckaufnehmers wurden die Druckwerte für 5 bis 10 Minuten aufgezeichnet. Die Drücke im rechten Ventrikel wurden als analoge Signale durch den flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer registriert, verstärkt und mit Hilfe eines PCs in digitale Signale übersetzt (Software „Pulmodyn“, A/D-Wandlerkarte). Die Tiertötung erfolgte durch eine Überdosierung der Narkose².

2. 6. 3 Präparation von Lunge und Herz

Die Präparation der Lunge für die histologische Bearbeitung und die Präparation des Herzens für das Auswiegen der Ventrikel wurden im Anschluss an die Messung des Drucks im rechten Ventrikel durchgeführt. Folgende Schritte erfolgten:

- a) Vollständige Eröffnung des Thorax
- b) Bestimmung des Hämatokrit
- c) Spülung der Lunge und des Herzens mit Perfusat
- d) Spülung der Lunge und des Herzens mit Zambonis Fixativ
- e) Freipräparation von Lunge und Herz
- f) Trennung der Lunge vom Herz
- g) Einlagerung der Lunge in Zambonis Fixativ und PBS

2. 6. 3. 1 Vollständige Eröffnung des Thorax

Im weiteren Verlauf wurde das Fell der Maus über dem Sternum entfernt. An dem bereits vorhandenen Schnitt im Zwerchfell beginnend wurde der Thorax der Maus mediosternal eröffnet und zu beiden Seiten auf der Korkplatte fixiert.

² Die Durchführung der Experimente bis zur Tiertötung wurde nicht selber vorgenommen.

2. 6. 3. 2 Bestimmung des Hämatokrits

Der linke Ventrikel wurde auf etwa 3mm aufgeschnitten. Das austretende Blut wurde mit einer Hämatokrit-Kapillare aufgefangen und der Hämatokritwert mit Hilfe einer Zentrifuge bestimmt.

2. 6. 3. 3 Spülung der Lunge und des Herzens mit Perfusat

Durch ein in die Pulmonalarterie geschnittenes, etwa 2mm langes Loch wurde ein Katheter eingeführt und durch das Zuziehen eines vorgelegten Knotens fixiert. Durch den Katheter wurde die Lunge nun mit 20ml Perfusat ausgespült. Die Perfusionsrate lag bei 2ml/min, der Abfluss des Perfusats erfolgte durch den Schnitt in der linken Kammer.

2. 6. 3. 4 Spülung der Lunge und des Herzens mit Zambonis Fixativ

Zunächst wurde die Beatmung im Zustand der maximalen Inspiration ausgeschaltet. Anschließend wurde mit der Spülung der Lunge mit Zambonis Fixativ begonnen. Die Spülung erfolgte für 15 Minuten mit einem Druck von 22cm Wassersäule.

2. 6. 3. 5 Freipräparation von Lunge und Herz

Die Trachea wurde während der Inspirationsphase ligiert und Herz und Lunge aus dem Thorax entnommen.

2. 6. 3. 6 Trennung der Lunge vom Herzen

Mit einer Schere wurde das Herz am Gefäßstiel von der Lunge getrennt. Zur weiteren Bearbeitung des Herzens siehe Kapitel 2. 6. 4.

2. 6. 3. 7 Einlagerung der Lunge

Die Lunge wurde über Nacht bei 4°C in Zambonis Fixativ eingelagert, anschließend wurden sie für 24h in 0,1M PBS eingelagert. Hiernach wurde das PBS erneuert und die Lunge verblieb dort bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

2. 6. 4 Präparation und Auswiegen des Herzens

Die Atrien und Herzklappen wurden entfernt und der rechte Ventrikel exakt am Septum entlang vom linken Ventrikel mit Septum getrennt. Rechter Ventrikel, sowie linker

Ventrikel mit Septum wurden zwei Wochen bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend gewogen.

2. 6. 5 Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Lunge

2. 6. 5. 1 Einbettung der Gewebe

Zur weiteren Verwendung der in PBS gelagerten Mauslunge kamen der obere Lappen des rechten Lungenflügels und als ein zusammenhängendes Präparat beide Lappen der linken Lunge. Die Gewebe wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässert; danach wurden sie in Paraffin eingegossen.

2. 6. 5. 2 Anfertigung von Schnittpräparaten

Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom 3µm dicke Scheiben geschnitten, die nach ihrer Streckung im Wasserbad auf Objektträger aufgebracht wurden. Hiernach wurden die Präparate auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank verwahrt.

2. 6. 5. 3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Schnitte wurden zunächst für 20 Minuten bei 65°C erhitzt. Dann durchliefen sie die folgende Alkoholreihe:

10 min	Roti- Histol
10 min	Roti- Histol
5 min	Roti- Histol
5 min	Ethanol absolut 99,6%
5 min	Ethanol absolut 99,6%
5 min	Ethanol 96%
5 min	Ethanol 70%
15 min	H ₂ O ₂ -Gemisch: 180 ml Methanol, 20ml H ₂ O ₂ 30%ig

2. 6. 5. 4 Immunhistochemie

Zwischen den einzelnen Schritten der immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate - wenn nicht anders erwähnt - einmalig für 5 Minuten in PBS gewaschen.

Färbung mit α -smooth-muscle-actin-Primärantikörper

5 min	Aqua dest.
10 min	Trypsin, auf 37°C erwärmt
15 min	Avidin Blocking
15 min	Biotin Blocking
15 min	10% BSA
60 min	M.O.M. Mouse Ig Blocking Reagenz
2x5 min	PBS
5 min	M.O.M. Diluent/ Proteinblocking
30 min	Primärantikörper α -smooth muscle-actin
2x5 min	PBS
10 min	M.O.M. biotinyliertes IgG Reagenz
2x5 min	PBS
5 min	M.O.M. ABC Reagenz
2x5 min	PBS
ca. 1 min	VECTOR Vip. Substrat Kit (Dauer nach Augenmaß bis zur Lilafärbung)
1 min	H ₂ O ohne zuvorige PBS Pufferung

Färbung mit von-Willebrand-Faktor-Primärantikörper

15 min	Avidin-Blocking
15 min	Biotin-Blocking
15 min	10% BSA
30 min	Blocking Serum (Goat)
30 min	vWF Primärantikörper (37°C) (Rabbit)
30 min	biotinylierter Sekundärantikörper (Goat)

30 min	ABC Reagenz
20-30 sec	DAB Substrat (Dauer nach Augenmaß bis zur Braunfärbung)
5 min	H ₂ O
2 min	Gegenfärbung mit Methylgrün auf einer Heizplatte bei 60°C
1 min	Aqua dest.

Dehydrierung und Eindecken in harzigem Medium

2 min	Ethanol 96%
5 min	Isopropylalkohol (99,8%)
5 min	Isopropylalkohol (99,8%)
5 min	Roti-Histol
5 min	Roti-Histol
5 min	Xylol
	Eindecken mit Pertex

2. 6. 6 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

Zur morphometrischen Analyse der Lungengefäße wurde das computergestützte Analyse- system „Leica Q Win Standard Analyzing Software“ mit von der Firma Leica speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelten Makros verwendet [103].

2. 6. 6. 1 Muskularisierungsgrad

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden 3µm Paraffinschnitte in immunhistochemischer Doppelfärbung mit Hilfe von Primärantikörpern gegen α -smooth-muscle-actin und von-Willebrand-Faktor gefärbt, wie im Färbeprotokoll angeführt.

Pro Tier wurden je nach Gefäßgröße in 100, 200 bzw. 400facher Vergrößerung untersucht:

- 80 kleine intraazinäre pulmonale Gefäße mit einem externen Gefäßdurchmesser von 20 bis 70µm

- 15 mittlere pulmonale Gefäße mit einem externen Gefäßdurchmesser von > 70-150µm
- 5 große pulmonale Gefäße mit einem externen Gefäßdurchmesser von über 150µm

Die untersuchten Gefäße wurden als voll muskularisiert, teilmuskularisiert oder nicht muskularisiert kategorisiert. Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen, wurde der Anteil an α -smooth-muscle-actin positiven Gefäßwandbereichen ermittelt. Dies wurde halbautomatisch mittels der oben genannten Leica Software durchgeführt. Nichtmuskularisierte Gefäße waren in gleicher Art und Weise durch die braune Färbung des endothelialen von-Willebrand-Faktors identifizierbar.

Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden wie folgt festgesetzt:

- nicht muskularisiert: $\leq 4\%$ Anteil von α -smooth-muscle-actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- partiell muskularisiert: $> 4\%$ und $\leq 75\%$ Anteil von α -smooth-muscle-actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- voll muskularisiert: $> 75\%$ Anteil von α -smooth-muscle-actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia

Die errechneten Werte (Außendurchmesser, Innendurchmesser, mittlere Wandstärke in % und absolut, Muskularisierungsgrad in %, Lumenfläche) wurden direkt nach Auswertung jedes Gefäßes automatisch in Excel überführt und in die entsprechenden Gefäßkategorien eingeordnet.

2. 6. 7 Statistische Auswertung

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Die n-Zahl der Gruppen ist jeweils in der Darstellung angegeben. Beim Vergleich mehrerer experimenteller Gruppen wurde eine Varianzanalyse mit dem Student-Newman-Keuls-Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Zum Vergleich von nur zwei Versuchsgruppen kam der t-Test zur Anwendung. Ein p -Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3. 1 Zusammenfassung ermittelter Parameter

Folgende Parameter wurden in folgenden Versuchen ausgewertet:

3. 1. 1 Isoliert perfundierte Lunge

- pulmonalarterieller Druck (PAP), gemessen in mmHg. Die Stärke einer Vasokonstriktion ist zur Darstellung gebracht in Relation zur Nulllinie, definiert als normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) unmittelbar vor der ersten Intervention durch Hypoxie oder U-46619-Applikation.

3. 1. 2 Chronische, durch Hypoxie induzierte pulmonale Hypertonie

- Körpergewicht in Gramm
- Hämatokrit in Prozent
- Rechtsventrikulärer Druck, gemessen in mmHg
- Gewichte des rechten und linken Herzens einschließlich Ventrikelseptum in Gramm
- Muskularisierungsgrad der verschiedenen Gefäßgrößen prozentual zur Gesamtzahl

3. 2 Versuche zur akuten hypoxischen Ventilation

Versuchsbeschreibung: Kapitel 2. 5. 4.

Der durch akute hypoxische Beatmung induzierte pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) der normoxisch gehaltenen Tiere lag in der ersten hypoxischen Ventilationsphasen für die SDHD +/- Tiere bei $1,2 \pm 0,2$ mmHg, in der zweiten Hypoxiephase bei $1,3 \pm 0,2$ mmHg (jeweils n=5) (Abb.11). Der durch hypoxische Beatmung induzierte pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) der Wildtypen lag in der ersten hypoxischen Ventilationsphase bei $1,4 \pm 0,2$ mmHg und in der zweiten Hypoxiephase bei $1,5 \pm 0,3$ mmHg (jeweils n=5).

Nach drei Wochen chronischer hypoxischer Exposition der Mäuse (10% O₂, normobar) konnte in den Wildtypmäusen eine Verringerung der Stärke der hypoxischen

Vasokonstriktion (Δ PAP) gegenüber den normoxisch gehaltenen Mäusen nachgewiesen werden (Abb.11).

Unter der ersten hypoxischen Ventilation der chronisch hypoxischen SDHD +/- Tiere lag die Stärke der hypoxischen Vasokonstriktion (Δ PAP) bei $0,7 \pm 0,1$ mmHg, in der zweiten Hypoxiephase bei $0,7 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6). Bei den Wildtypen lag die Stärke der hypoxischen Vasokonstriktion (Δ PAP) entsprechend bei $0,7 \pm 0,1$ mmHg in der ersten und $0,7 \pm 0,1$ mmHg in der zweiten hypoxischen Ventilationsphase (jeweils n=6). Ein signifikanter Unterschied war zwischen den normoxisch und chronisch hypoxisch gehaltenen Wildtypen in der zweiten Hypoxiephase zu messen (Abb.11).

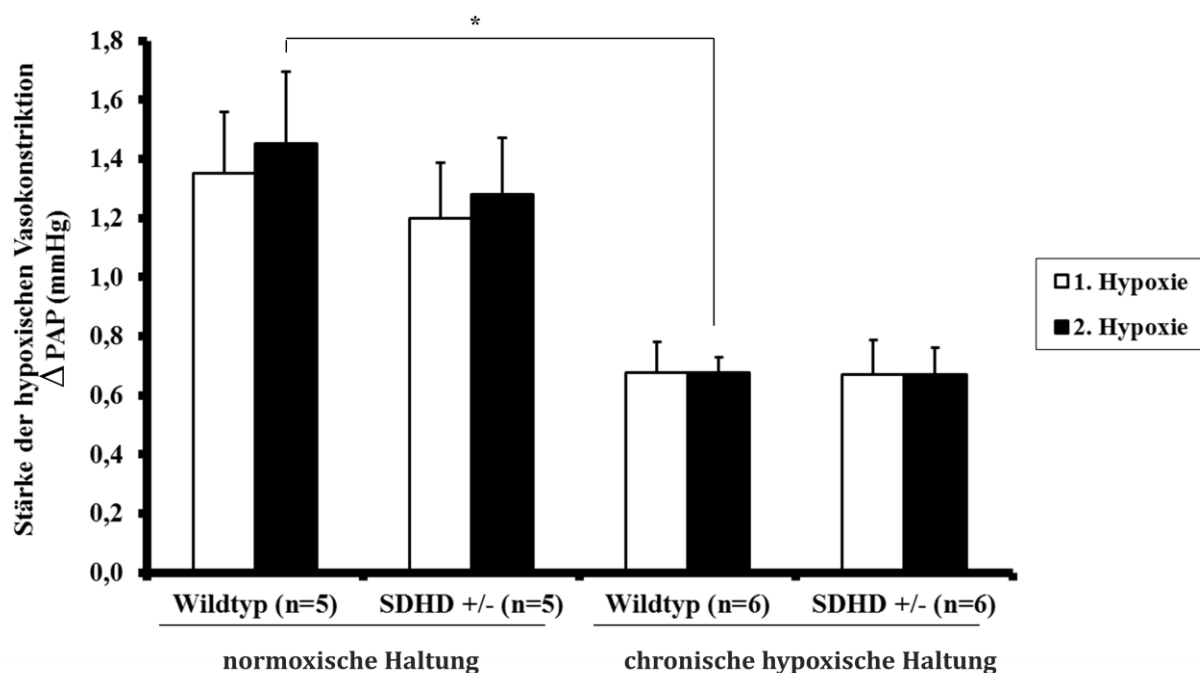


Abb. 11 Stärke der hypoxischen Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäusungen nach chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) oder normoxischer (21% O₂, normobar) Haltung
Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) der ersten und zweiten hypoxischen Ventilationsphase bei Tieren beider Genotypen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Bei den normoxisch gehaltenen Tieren ergab die Quantifizierung des normoxischen pulmonalarteriellen Drucks für die Wildtypen vor der ersten hypoxischen Ventilationsphase einen Wert von $8,7 \pm 0,5$ mmHg und vor der zweiten hypoxischen

Ventilationsphase einen Wert von $8,6 \pm 0,6 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$). Die Werte für die SDHD +/- Tiere lagen bei $8,3 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ und $8,1 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 12). Durch chronische Hypoxieexposition erhöhte sich der normoxische pulmonalarterielle Druck bei den Wildtypmäusen auf $11,1 \pm 0,1 \text{ mmHg}$ und $10,5 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ ($n=6$). Bei den SDHD +/- Tieren erhöhte sich der PAP auf $11,4 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ und $11,2 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ ($n=6$) (Abb. 12).

Signifikant unterschieden sich jeweils die pulmonalarteriellen Drücke der Tiere des gleichen Genotyps aus normoxischer und chronischer hypoxischer Haltung.

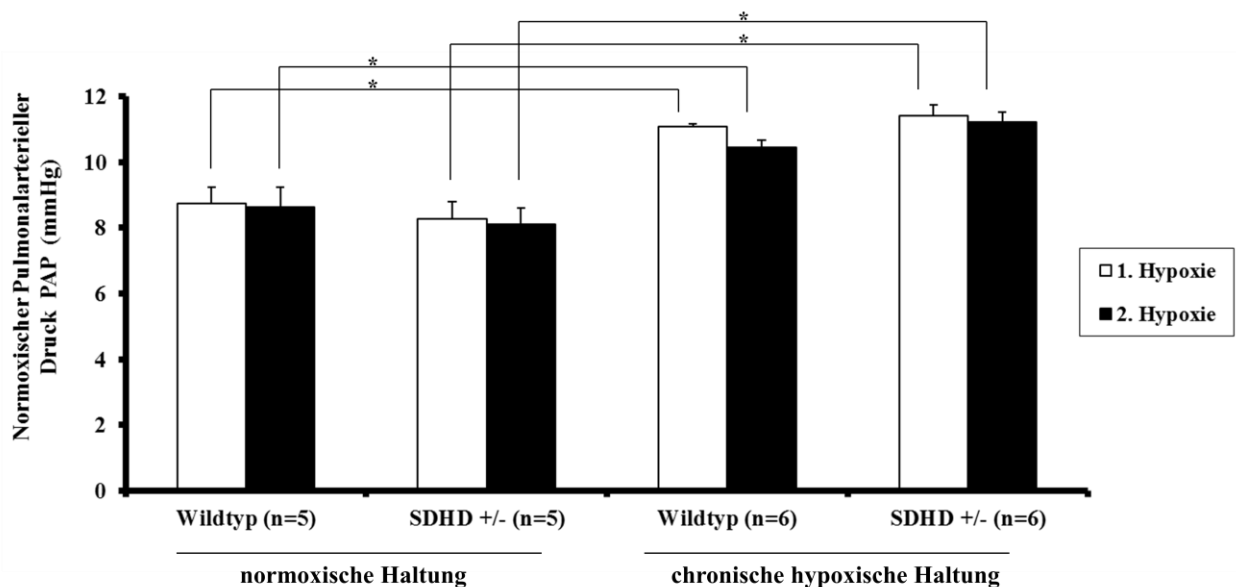


Abb. 12 Normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) in Wildtyp und SDHD +/- Mäuselungen nach chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) oder normoxischer (21% O₂, normobar) Haltung
Dargestellt ist der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) vor der jeweiligen hypoxischen Ventilationsphase (1. bzw. 2. Hypoxie). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 3 Versuche mit dem Thromboxananalogon U-46619

Versuchsbeschreibung: Kapitel 2. 5. 5.

Der U-46619-induzierte pulmonalarterielle Druckanstieg (ΔPAP) der normoxisch gehaltenen Wildtypmäuse lag nach dem ersten U-46619-Bolus bei $1,7 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ und nach dem zweiten Bolus bei $1,5 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 13). Der U-46619-induzierte pulmonalarterielle Druckanstieg (ΔPAP) der SDHD +/- Mäuse betrug nach

dem ersten U-46619-Bolus $0,9 \pm 0,1\text{mmHg}$ und nach dem zweiten Bolus $0,8 \pm 0,1\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 13).

Der U-46619-induzierte pulmonalarterielle Druckanstieg (ΔPAP) bei chronisch hypoxisch gehaltenen Tieren (10% O_2 , normobar) lag bei den Wildtypen nach dem ersten U-46619-Bolus bei $3,4 \pm 0,3\text{mmHg}$, bei den SDHD +/- Tieren bei $3,1 \pm 0,4\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$). Der zweite U-46619-Bolus induzierte bei den Wildtypen einen ΔPAP von $4,2 \pm 0,5\text{mmHg}$, bei den SDHD +/- Tieren lag er bei $3,6 \pm 0,5\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$).

Signifikant waren die Unterschiede zwischen den Tieren der gleichen Genotypen aus normoxischer und chronischer hypoxischer Haltung (Abb. 13).

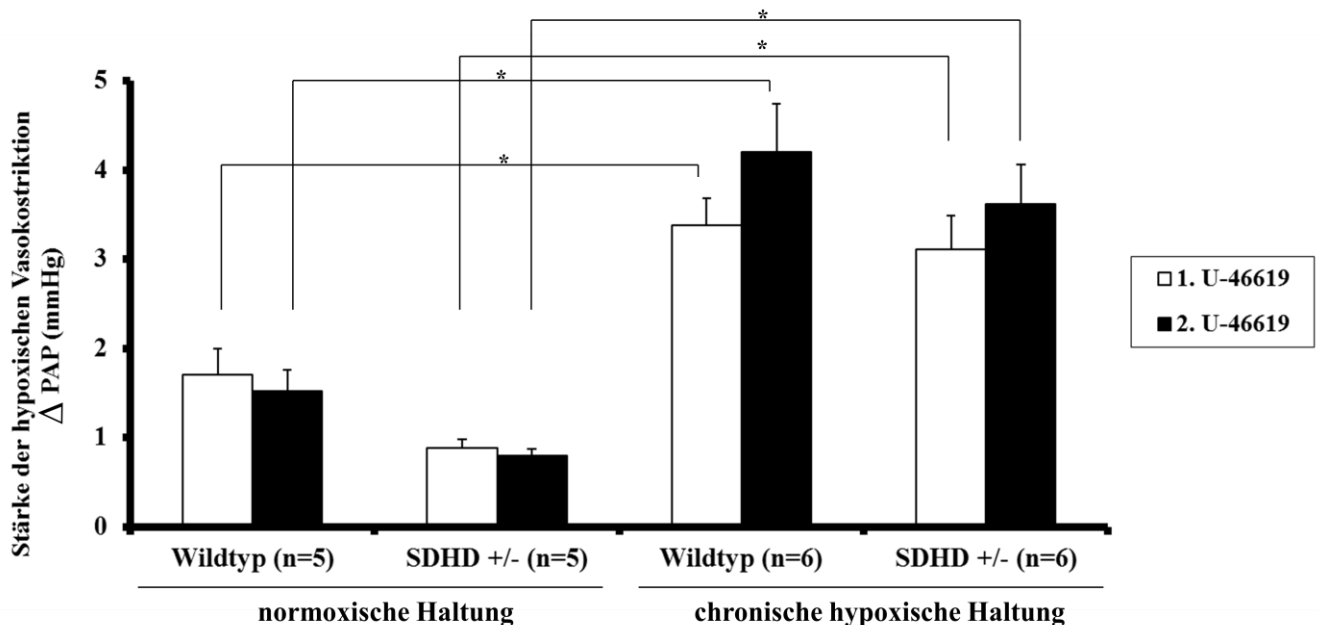


Abb. 13 Stärke der U-46619-induzierten Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäuselungen nach chronischer hypoxischer (10% O_2 , normobar) oder normoxischer (21% O_2 , normobar) Haltung

Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (ΔPAP) ausgelöst durch einen U-46619-Bolus. Dargestellt sind die Werte für die erste und zweite Bolusgabe für Tiere beider Genotypen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Bei den normoxisch gehaltenen Tieren ergab die Quantifizierung des normoxischen pulmonalarteriellen Drucks (PAP) für die Wildtypen vor dem ersten U-46619-Bolus einen Wert von $8,4 \pm 0,7\text{mmHg}$, vor dem zweiten Bolus lag er bei $9,5 \pm 1,3\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 14). Bei den SDHD +/- Tieren lag der PAP zunächst bei $8,0 \pm 0,6\text{mmHg}$, vor dem zweiten U-46619- Bolus lag er bei $8,2 \pm 0,5\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$). Bei den chronisch hypoxisch gehaltenen Tieren (10% O_2 , normobar) lag der PAP vor

dem ersten Bolus bei den Wildtypen bei $10,2 \pm 0,2 \text{ mmHg}$, vor dem zweiten Bolus lag er bei $10,0 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$). Der PAP der entsprechenden SDHD +/- Tiere betrug vor dem ersten U-46619-Bolus $10,8 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ und vor dem zweiten Bolus $10,6 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$). Signifikant war der Unterschied zwischen den normoxisch gehaltenen SDHD +/- Tieren im Vergleich zu den hypoxisch gehaltenen SDHD +/- Tieren vor dem ersten U-46619 Bolus (Abb. 14).

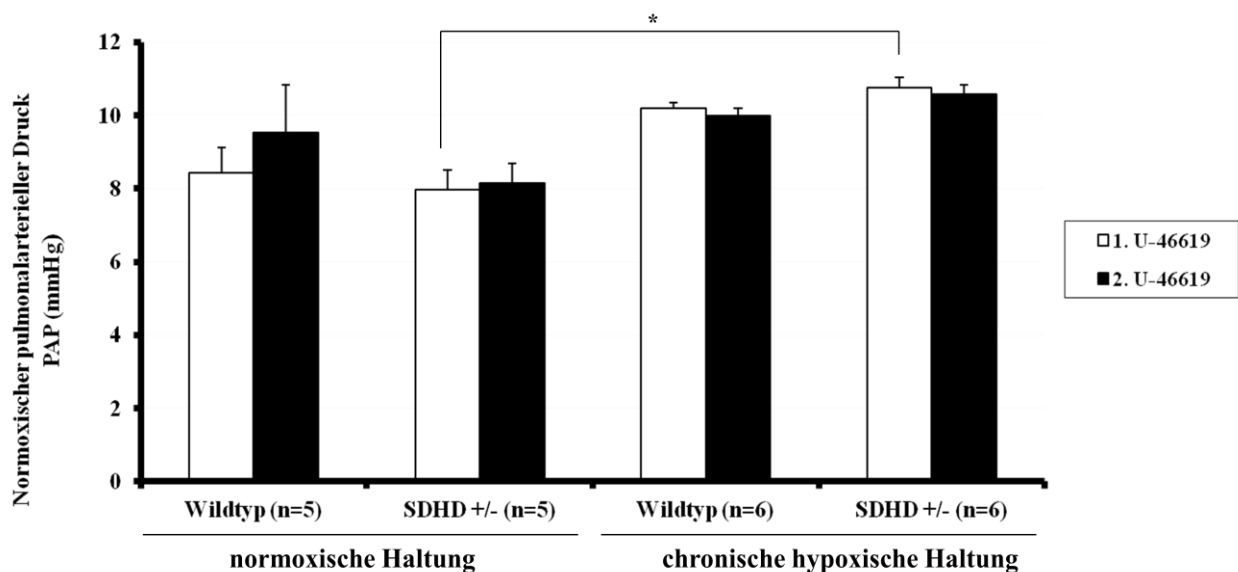


Abb. 14 Normoxischer pulmonaler arterieller Druck (PAP) in Wildtyp und SDHD +/- Mäuselungen nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung Dargestellt ist der normoxische pulmonaler arterielle Druck (PAP) unmittelbar vor dem ersten und zweiten U-46619-Bolus. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 4 Akute hypoxische Vasokonstriktion im Vergleich zur Vasokonstriktion ausgelöst durch U-46619 in normoxisch und chronisch hypoxisch gehaltenen Mäusen

Versuchsbeschreibungen Kapitel 2. 5. 4 und 2. 5. 5.

In dieser Darstellung handelt es sich um eine Zusammenfassung oben bereits aufgeführter Werte, die hier zur Vergleichbarkeit nebeneinander dargestellt sind. Es sind jeweils die erste akute Hypoxiephase und der 1. U-46619 Bolus dargestellt, da für den ersten U-46619-Bolus eine Interferenz mit einem vorangegangenen U-46619-Bolus ausgeschlossen werden kann.

Der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) normoxisch gehaltener Mäuse lag bei der ersten akuten hypoxischen Beatmung bei $1,4 \pm 0,2$ mmHg für die Wildtypen und $1,2 \pm 0,2$ mmHg für die SDHD +/- Tiere (jeweils n=5) (Abb. 15). Unter Einwirkung des ersten U-46619-Bolus lagen die Werte der entsprechenden Tiere bei $1,7 \pm 0,3$ mmHg für die Wildtypen und $0,9 \pm 0,1$ mmHg für die SDHD +/- Tiere (jeweils n=5). Nach chronischer hypoxischer Haltung (10% O₂, normobar) betrug der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) für die Wildtypen unter akuter hypoxischer Ventilation $0,7 \pm 0,1$ mmHg, der Wert der SDHD +/- Mäuse betrug ebenfalls $0,7 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6). Der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) nach dem ersten U-46619-Bolus lag bei den chronisch hypoxisch gehaltenen Wildtypmäusen bei $3,4 \pm 0,3$ mmHg und bei den heterozygot gendefizienten Mäusen bei $3,1 \pm 0,4$ mmHg (jeweils n=6) (Abb. 15). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den Genotypen auf die Gabe des ersten U-46619-Bolus hin, wenn man die normoxisch gehaltenen Tiere mit den chronisch hypoxisch gehaltenen vergleicht. Weiterhin war der pulmonalarterielle Druckunterschied auf die erste Hypoxiephase im Vergleich zum Druckunterschied auf U-46619 bei hypoxisch gehaltenen Wildtypen signifikant geringer.

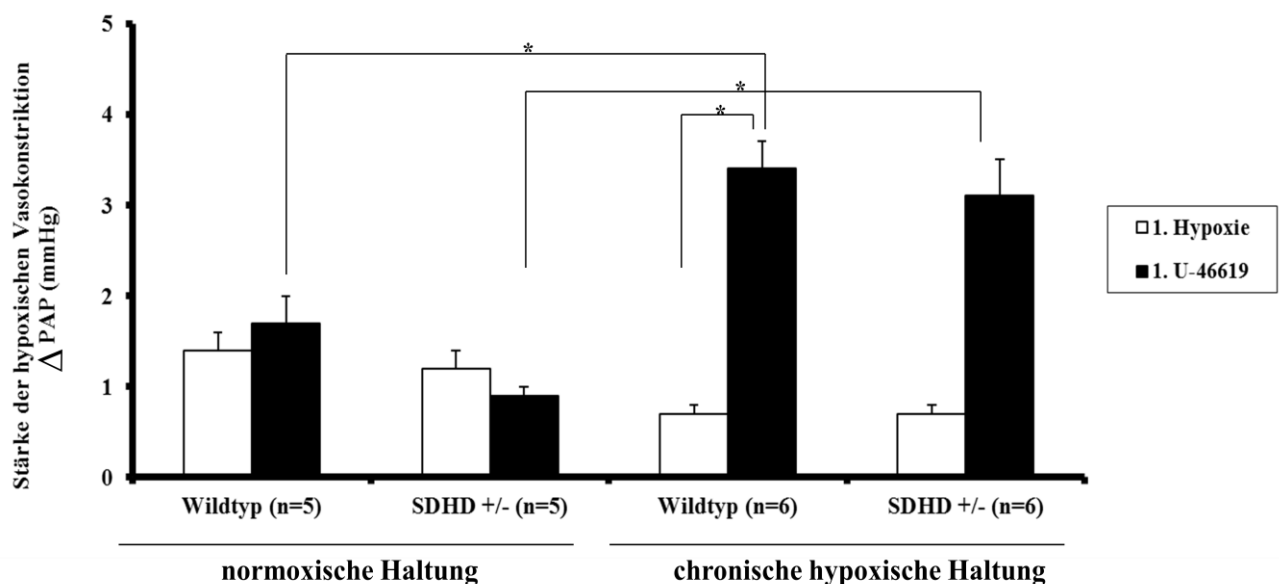


Abb. 15 Stärke der hypoxischen und U-46619-induzierten Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäusungen nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung

Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstieges (Δ PAP) nach der ersten akuten Hypoxiephase (1. Hypoxie) und dem ersten U-46619-Bolus (1. U-46619) bei Tieren beider Genotypen nach normoxischer und chronischer hypoxischer Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Auch in der folgenden Darstellung handelt es sich um eine Aufbereitung oben bereits dargestellter Ergebnisse, die Werte des pulmonalarteriellen Drucks vor der ersten Hypoxiephase und der ersten U-46619-Gabe sind vergleichend dargestellt. Bei den normoxisch gehaltenen Tieren ergab die Quantifizierung des normoxischen pulmonalarteriellen Drucks (PAP) für die Wildtypen vor der ersten akuten hypoxischen Ventilationsphase einen Wert von $8,7 \pm 0,5 \text{ mmHg}$, vor dem ersten U-46619-Bolus lag er bei $8,4 \pm 0,7 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 16). Bei den normoxisch gehaltenen SDHD +/- Tieren lagen die entsprechenden Werte für die erste akute Hypoxiephase bei $8,3 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ und vor dem ersten U-46619-Bolus bei $8,0 \pm 0,6 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$). Bei den chronisch hypoxisch gehaltenen Tieren (10% O₂, normobar) lag der PAP bei den Wildtypen vor der ersten akut hypoxischen Ventilationsphase bei $11,1 \pm 0,1 \text{ mmHg}$ und vor der ersten U-46619-Zugabe bei $10,2 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$). Bei den heterozygot gendefizienten SDHD-Mäusen lag der PAP nach chronisch hypoxischer Haltung vor der ersten hypoxischen Ventilationsphase bei $11,4 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ und vor dem ersten U-46619-Bolus bei $10,8 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$) (Abb. 16).

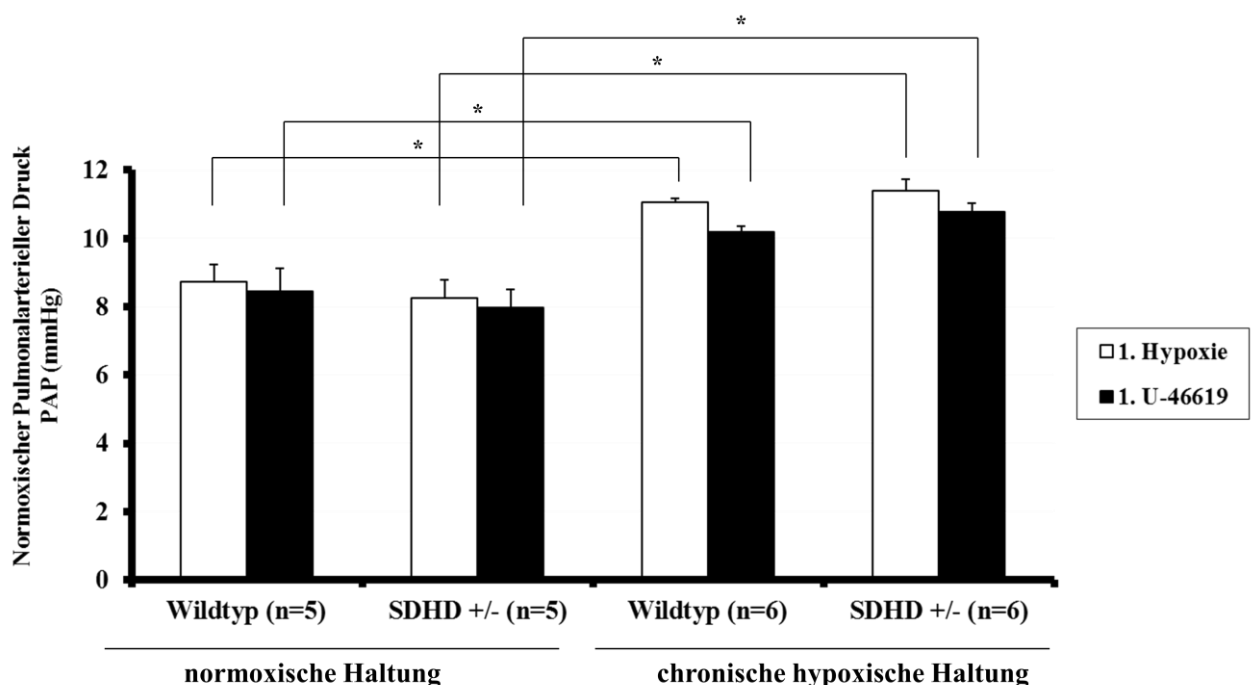


Abb. 16 Normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) in Wildtyp- und SDHD +/- Mäuselungen vor akuter Hypoxie und vor U-46619-induzierter Vasokonstriktion nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung
Dargestellt ist der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) unmittelbar vor der ersten akuten hypoxischen Ventilationsphase (1. Hypoxie) oder dem ersten U-46619-Bolus (1. U-46619). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 5 Versuche zur akuten hypoxischen Beatmung in Gegenwart von L-NNA

Versuchsbeschreibung: Kapitel 2. 5. 6

Unter Einwirkung von L-NNA lag der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) in der ersten hypoxischen Ventilationsphase bei normoxisch gehaltenen Wildtypen bei $2,2 \pm 0,3$ mmHg und bei den SDHD +/- Tieren bei $1,8 \pm 0,3$ mmHg (jeweils n=5) (Abb. 17). Bei der zweiten hypoxischen Ventilationsphase lag Δ PAP für die normoxisch gehaltenen Wildtypen bei $1,8 \pm 0,2$ mmHg, für die SDHD +/- Tiere lag er bei $1,8 \pm 0,5$ mmHg.

Nach chronischer hypoxischer Haltung (10% O₂, normobar) lag der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) in Gegenwart von L-NNA für die Wildtypen in der ersten Hypoxiephase bei $0,9 \pm 0,1$ mmHg und für die SDHD +/- Tiere bei $0,9 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6). In der zweiten hypoxischen Ventilationsphase lag der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) für die Wildtypen bei einem Mittelwert von $0,8 \pm 0,1$ mmHg und für die genetisch veränderten SDHD +/- Mäuse bei $0,8 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6) (Abb. 17).

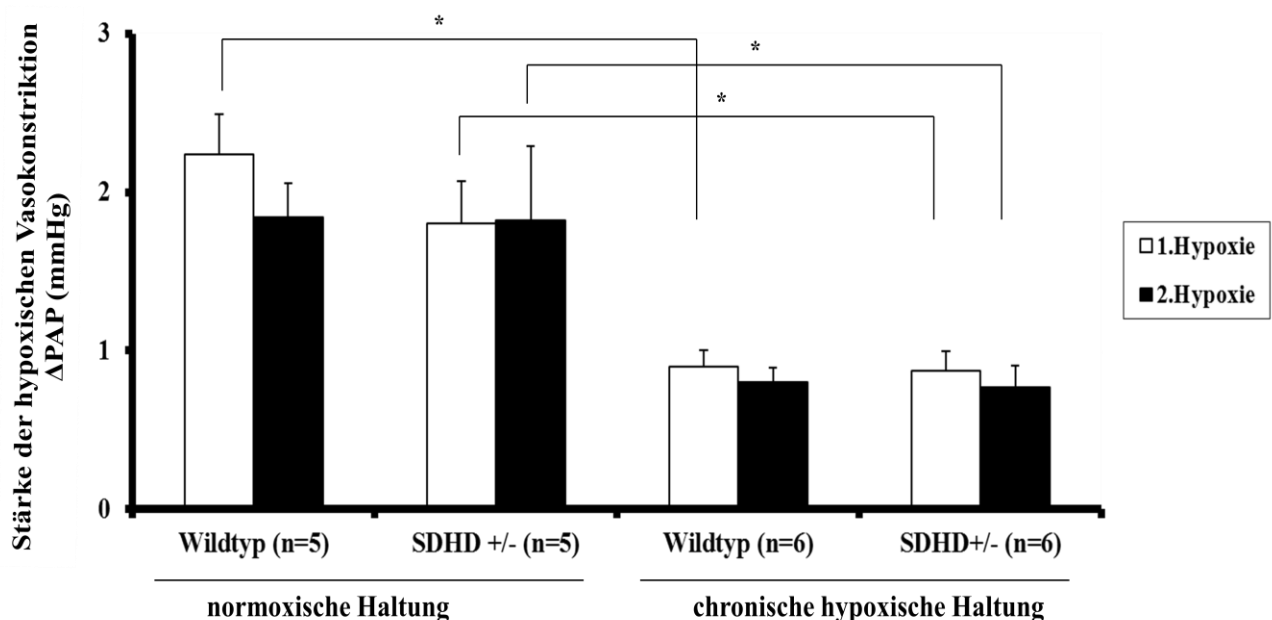


Abb. 17 Stärke der hypoxischen Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäusungen nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung in Gegenwart von L-NNA

Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) unter zwei akuten hypoxischen Ventilationsphasen bei Tieren beider Genotypen nach normoxischer oder chronischer hypoxischer Haltung in Gegenwart von L-NNA. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Bei den normoxisch gehaltenen Tieren ergab die Quantifizierung des normoxischen pulmonalarteriellen Drucks (PAP) in Gegenwart von L-NNA für die Wildtypen vor der ersten akuten hypoxischen Ventilationsphase einen Wert von $9,2 \pm 1,1 \text{ mmHg}$, bei den SDHD +/- Tieren lag er bei $8,4 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 18). Der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) vor der zweiten hypoxischen Ventilationsphase betrug bei den Wildtypen $9,4 \pm 0,9 \text{ mmHg}$ und $8,6 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ bei den SDHD +/- Tieren (jeweils $n=5$).

Bei den chronisch hypoxisch gehaltenen Mäusen (10% O₂, normobar) lag der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) vor der ersten hypoxischen Ventilationsphase bei den Wildtypen bei $9,9 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ und bei den SDHD +/- Tieren bei $10,4 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$). Vor der zweiten Hypoxiephase lag der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) der Wildtypmäuse bei $10,0 \pm 0,2 \text{ mmHg}$, der pulmonalarterielle Druck (PAP) der SDHD +/- Tiere lag bei $10,5 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$) (Abb. 18).

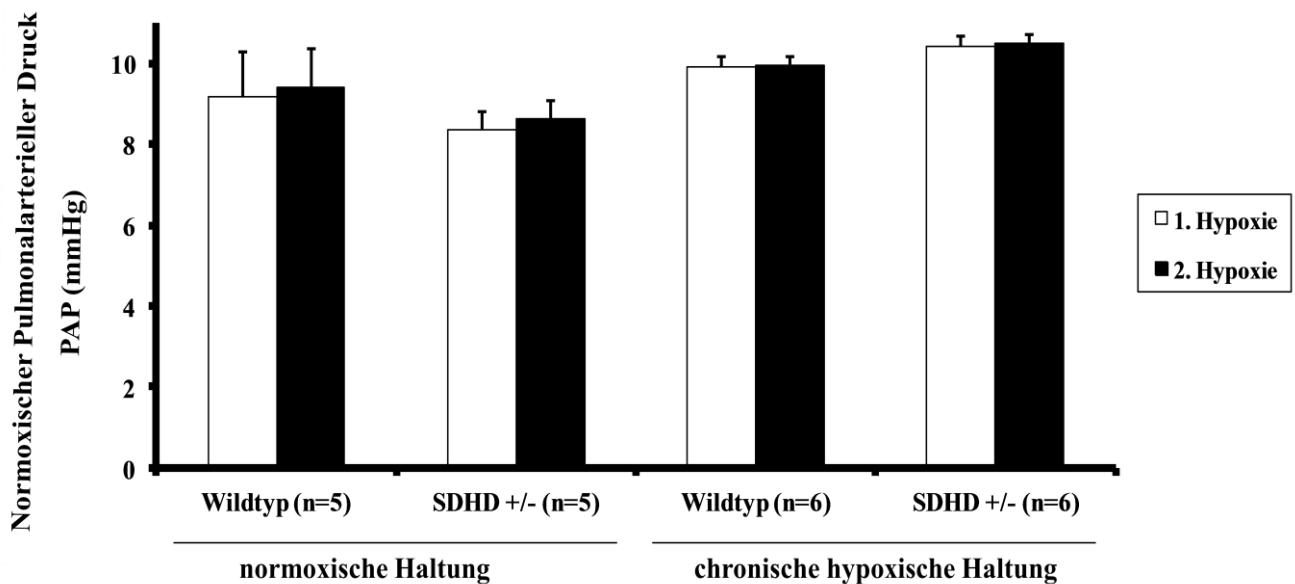


Abb. 18 Normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung in Gegenwart von L-NNA in Wildtyp- und SDHD +/- Mäuselungen vor akuter Hypoxie

Dargestellt ist der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) direkt vor der ersten und zweiten akuten hypoxischen Ventilationsphase. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3. 6 Versuche zur U-46619-induzierten Vasokonstriktion in Gegenwart von L-NNA

Versuchsbeschreibung Kapitel 2. 5. 7.

Unter Einwirkung von L-NNA lag der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP), ausgelöst durch den ersten U-46619-Bolus, bei normoxisch gehaltenen Wildtypen bei $2,7 \pm 0,5$ mmHg, bei SDHD +/- Tieren lag er bei $2,4 \pm 0,4$ mmHg (jeweils n=5) (Abb. 19). Der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) nach dem zweiten U-46619-Bolus lag für die Wildtypen bei $1,9 \pm 0,2$ mmHg, bei den genetisch veränderten Tieren ebenfalls bei $1,9 \pm 0,2$ mmHg (jeweils n=5). Unter chronischen hypoxischen Bedingungen (10% O₂, normobar) gehaltene Tiere wiesen unter L-NNA infolge des ersten U-46619-Bolus bei den Wildtypen einen pulmonalarteriellen Druckanstieg (Δ PAP) von $8,8 \pm 0,8$ mmHg und bei den SDHD +/- Tieren von $7,0 \pm 1,1$ mmHg auf (jeweils n=6). Der zweite U-46619-Bolus führte bei den Wildtypen zu einem pulmonalarteriellen Druckanstieg (Δ PAP) von $10,7 \pm 1,2$ mmHg und bei den SDHD +/- Tieren zu einem pulmonalarteriellen Druckanstieg von $7,4 \pm 1,1$ mmHg (jeweils n=6) (Abb. 19).

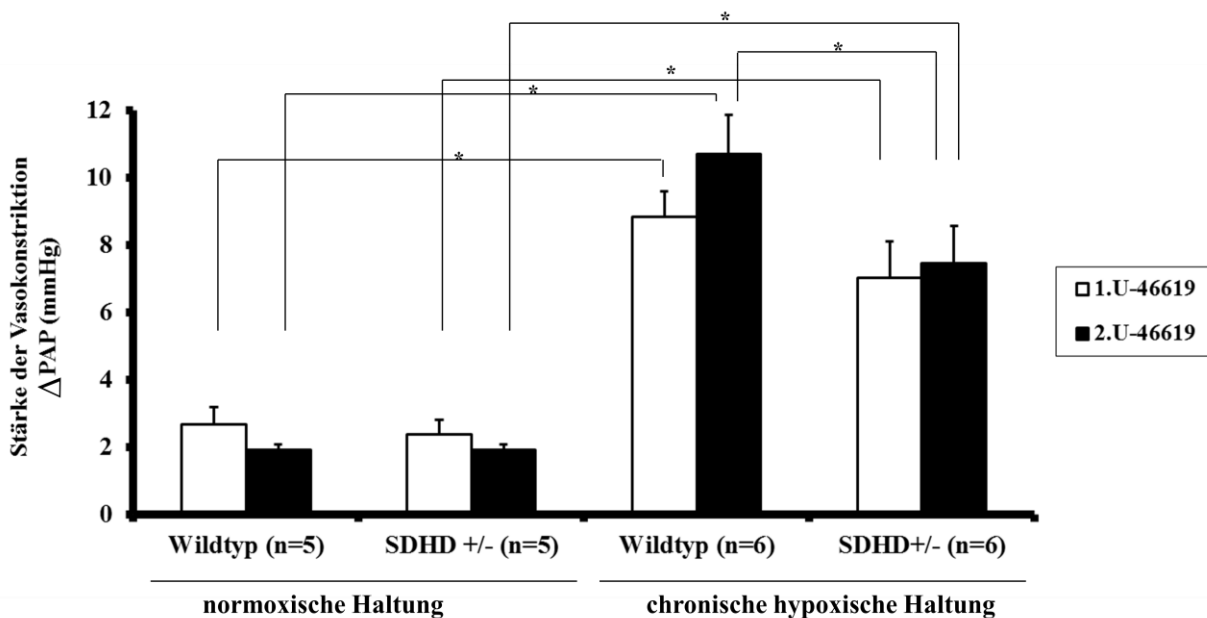


Abb. 19 Stärke des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) als Reaktion auf U-46619 in SDHD +/- und Wildtyp-Mäusungen nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung und in Gegenwart von L-NNA

Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) unter Zugabe zweier U-46619-Boli bei Tieren beider Genotypen nach normoxischer oder chronischer hypoxischer Haltung in Gegenwart von L-NNA. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Bei den normoxisch gehaltenen Tieren ergab die Quantifizierung des normoxischen pulmonalarteriellen Drucks (PAP) unter L-NNA für die Wildtypen vor Zugabe des ersten U-46619-Bolus einen Wert von $9,9 \pm 1,1\text{mmHg}$ und für die genetisch veränderten Tiere einen Wert von $9,2 \pm 0,4\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 20). Vor dem zweiten Bolus lag der PAP für die Wildtypen bei $10,7 \pm 0,9\text{mmHg}$, für die SDHD+/- Tiere lag er bei $9,4 \pm 0,5\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$).

Für die unter chronischen hypoxischen Bedingungen gehaltenen Tiere (10% O₂, normobar) lag der normoxische pulmonalarterielle Druck unter L-NNA vor dem ersten U-46619-Bolus für die Wildtypmäuse bei $10,1 \pm 0,3\text{mmHg}$, für die SDHD +/- Tiere lag er bei $10,9 \pm 0,2\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$). Vor dem zweiten U-46619-Bolus lag der PAP der Wildtypen bei $10,4 \pm 0,3\text{mmHg}$, der der SDHD +/- Tiere lag bei $11,1 \pm 0,2\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$) (Abb. 20).

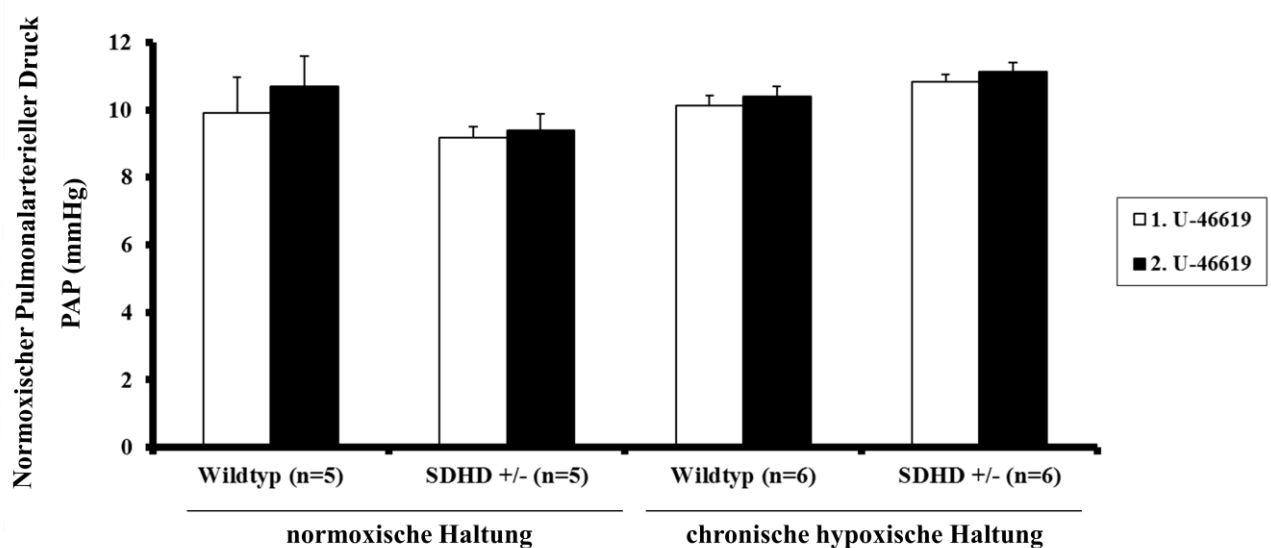


Abb. 20 Normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) in Gegenwart von L-NNA in Wildtyp- und SDHD +/- Lungen vor zwei U-46619-Boli nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung

Dargestellt ist der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) direkt vor dem ersten und zweiten U-46619-Bolus.

3. 7 Akute hypoxische Vasokonstriktion im Vergleich zur Vasokonstriktion ausgelöst durch U-46619 in Gegenwart von L-NNA

Versuchsbeschreibungen unter 2. 5. 6. und 2. 5. 7.

In Gegenwart von L-NNA lag der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) der normoxisch gehaltenen Wildtypmäuse auf die erste hypoxische Ventilationsphase hin bei $2,2 \pm 0,3$ mmHg, bei SDHD +/- Tieren lag er bei $1,8 \pm 0,3$ mmHg (jeweils n=5) (Abb. 21). Auf den ersten U-46619-Bolus reagierten die normoxisch gehaltenen Wildtypen in Gegenwart von L-NNA mit einem pulmonalarteriellen Druckanstieg (Δ PAP) von $2,7 \pm 0,5$ mmHg, genetisch veränderte Tiere reagierten mit einem Druckanstieg von $2,4 \pm 0,4$ mmHg (jeweils n=5). Der pulmonalarterielle Druckanstieg (Δ PAP) der hypoxisch gehaltenen Tiere (10% O₂, normobar) in Gegenwart von L-NNA lag für die erste hypoxische Ventilationsphase bei Wildtypmäusen bei $0,9 \pm 0,1$ mmHg, für die SDHD +/- Tiere bei $0,9 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6). Auf den ersten U-46619-Bolus reagierten die Wildtypen unter den gleichen Bedingungen mit einem pulmonalarteriellen Druckanstieg (Δ PAP) von $8,8 \pm 0,8$ mmHg, die SDHD +/- Tiere mit einem Druckanstieg von $7,0 \pm 1,1$ mmHg (jeweils n=6) (Abb. 21).

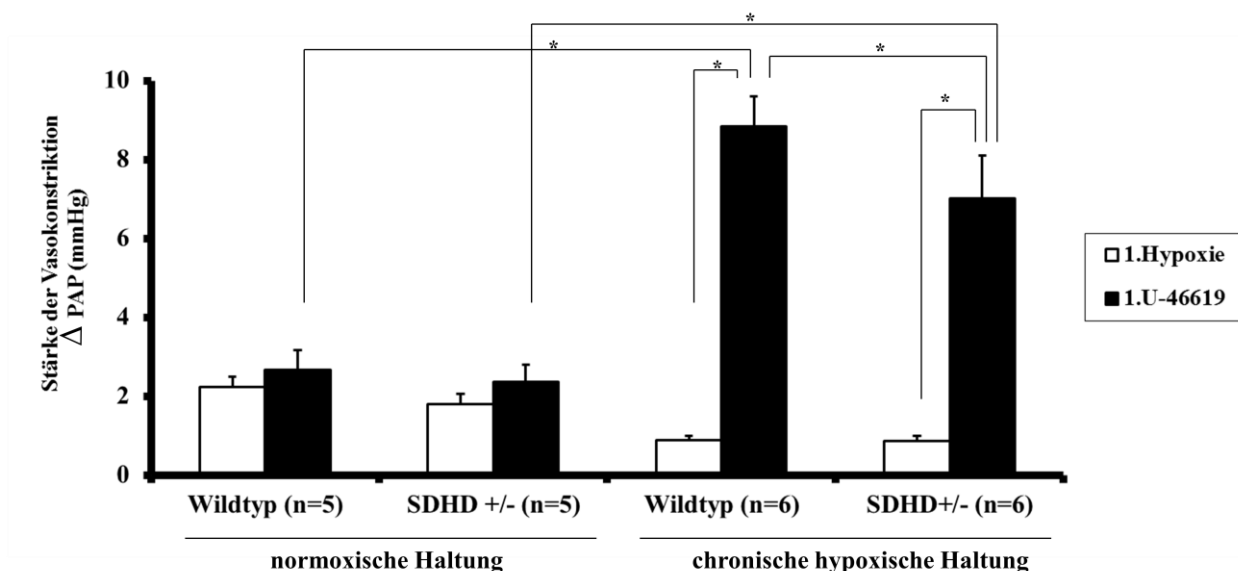


Abb. 21 Stärke des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) als Reaktion auf akute hypoxische Ventilation oder U-46619-Zugabe in SDHD +/- und Wildtyp-Mauslungen nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung; in Gegenwart von L-NNA

Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) in der ersten hypoxischen Ventilationsphase (1. Hypoxie) und dem ersten U-46619-Bolus (1. U-46619) bei Tieren beider Genotypen nach normoxischer oder chronischer hypoxischer Haltung in Gegenwart von L-NNA. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) unter L-NNA zum Zeitpunkt vor der ersten hypoxischen Ventilationsphase ergab für die normoxisch gehaltenen Wildtypen einen Wert von $9,2 \pm 1,1 \text{ mmHg}$, für die SDHD +/- Tiere bei $8,4 \pm 0,5 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 22). Vor der Zugabe des ersten U-46619-Bolus lag er für die Wildtyptiere bei $9,9 \pm 1,1 \text{ mmHg}$, für die SDHD +/- Tiere lag er bei $9,2 \pm 0,4 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=5$). Für die unter chronisch hypoxischen Bedingungen (10% O_2 , normobar) gehaltenen Tiere lag der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) unter L-NNA für die Wildtypen vor der ersten Hypoxiephase bei $9,9 \pm 0,3 \text{ mmHg}$ und für die SDHD +/- Tiere bei $10,4 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$). Vor dem ersten U-46619-Bolus lagen die entsprechenden Werte für die Wildtypen bei $10,1 \pm 0,3 \text{ mmHg}$, für die genetisch veränderten Mäuse lag er bei $10,9 \pm 0,2 \text{ mmHg}$ (jeweils $n=6$) (Abb. 22).

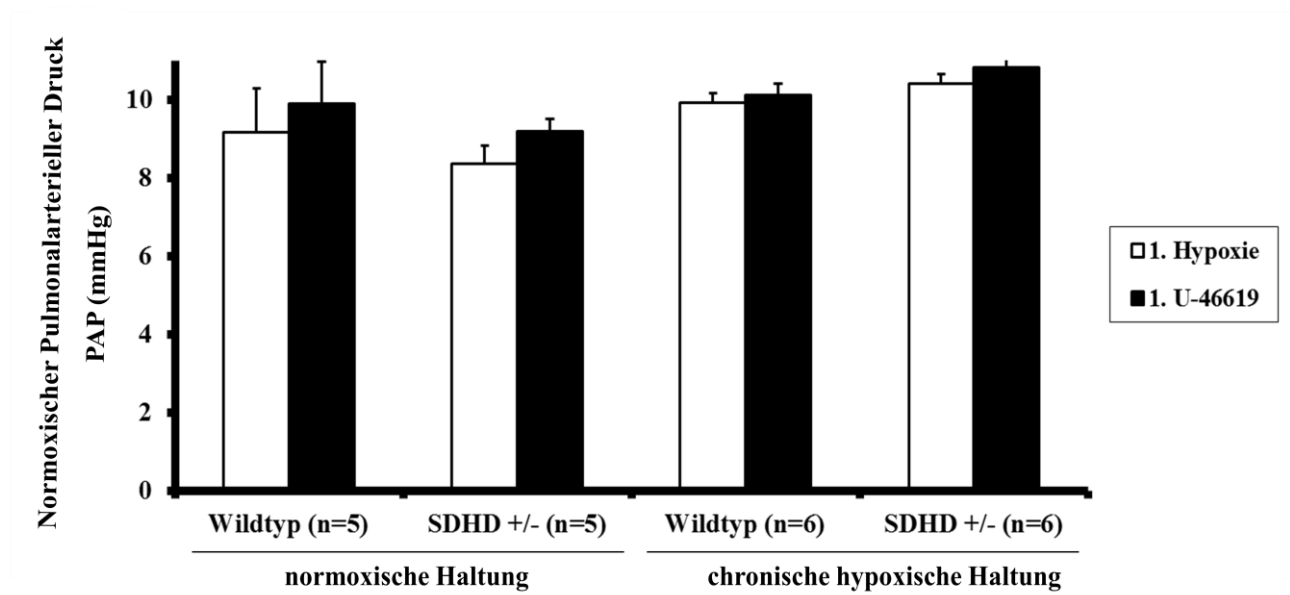


Abb. 22 Normoxisch pulmonalarterieller Druck (PAP) in Gegenwart von L-NNA in Wildtyp- und SDHD +/- Lungen vor akuter hypoxischer Ventilation und vor Zugabe von U-46619 nach normoxischer (21% O_2 , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O_2 , normobar) Haltung

Dargestellt ist der normoxische pulmonalarterielle Druck (PAP) direkt vor der ersten hypoxischen Ventilationsphase (1. Hypoxie) und vor dem ersten U-46619-Bolus (1. U-46619). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

3. 8 Vergleich zwischen Vasokonstriktion durch akute hypoxische Beatmung und U-46619-induzierte Vasokonstriktion mit und ohne Gegenwart von L-NNA

Versuchsbeschreibung Kapitel 2. 5. 4 – 2. 5. 7

Ohne L-NNA und nach normoxischer Haltung erreichten die Wildtypiere unter akuter Hypoxie einen Wert von $1,4 \pm 0,2\text{mmHg}$, unter Zugabe von U-46619 lag der Wert bei $1,7 \pm 0,3\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 23). Die entsprechenden Werte der SDHD +/- Tiere lagen bei $1,2 \pm 0,2\text{mmHg}$ in akuter Hypoxie und bei $0,9 \pm 0,1\text{mmHg}$ unter Zugabe von U-46619 ($n=5$). Mit L-NNA und nach normoxischer Haltung erreichten die Wildtypen unter akuter hypoxischer Beatmung einen pulmonalarteriellen Druckunterschied (ΔPAP) von $2,2 \pm 0,3\text{mmHg}$, unter Zugabe von U-46619 lag der Wert bei $2,7 \pm 0,5\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$). Die normoxisch gehaltenen genetisch veränderten SDHD +/- Mäuse erreichten unter L-NNA in der akuten hypoxischen Ventilation einen Wert von $1,8 \pm 0,3\text{mmHg}$, unter Zugabe von U-46619 lag der Wert bei $2,4 \pm 0,4\text{mmHg}$ (jeweils $n=5$) (Abb. 23).

Bei den chronisch hypoxisch (10% O_2 , normobar) gehaltenen Mäusen erreichten die Wildtypen ohne Einfluss von L-NNA unter akuter hypoxischer Ventilation einen pulmonalarteriellen Druckanstieg von $0,7 \pm 0,1\text{mmHg}$, der Wert der SDHD +/- Tiere lag ebenfalls bei $0,7 \pm 0,1\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$). Auf die Zugabe von U-46619 hin erreichten die chronisch hypoxisch gehaltenen Wildtypen einen Wert von $3,4 \pm 0,3\text{mmHg}$, die genetisch veränderten SDHD +/- Mäuse erreichten einen Wert von $3,1 \pm 0,4\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$). Unter L-NNA lag der pulmonalarterielle Druckanstieg (ΔPAP) bei unter chronisch hypoxischen Bedingungen (10% O_2 , normobar) gehaltenen Wildtypmäusen unter akut hypoxischer Ventilation bei $0,9 \pm 0,1\text{mmHg}$, bei SDHD +/- Tieren lag er bei $0,9 \pm 0,1\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$). Unter Zugabe von U-46619 als Bolus erreichten die hypoxisch gehaltenen Wildtypen unter der Einwirkung von L-NNA einen Wert von $8,8 \pm 0,8\text{mmHg}$, der Wert der genetisch veränderten Tiere lag bei $7,0 \pm 1,1\text{mmHg}$ (jeweils $n=6$) (Abb. 23).

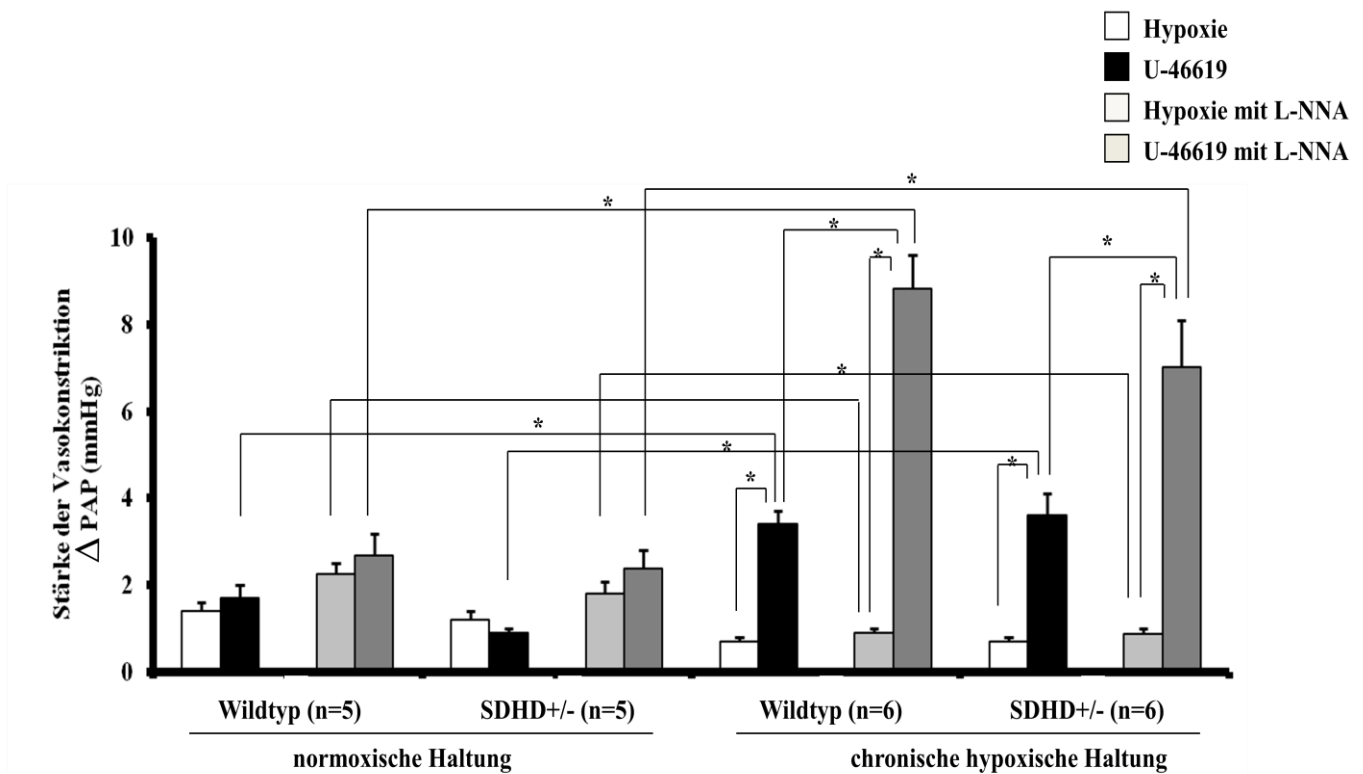


Abb. 23 Stärke des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) als Reaktion auf akute hypoxische Ventilation und U-46619-Zugabe in SDHD +/- und Wildtyp-Mauslungen, nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung, mit und ohne Gegenwart von L-NNA

Darstellung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) in der ersten hypoxischen Ventilationsphase (Hypoxie) und dem ersten U-46619-Bolus (U-46619) bei Tieren beider Genotypen nach normoxischer und chronischer hypoxischer Haltung mit und ohne Gegenwart von L-NNA. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3.9 Pulmonalarterieller Druckunterschied unter dreistündiger hypoxischer Ventilation

Versuchsabläufe Kapitel 2. 5. 8 und 2. 5. 9.

Bei den Versuchen wurde der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) von Wildtypmäusen und SDHD +/- Tieren unter dreistündiger hypoxischer Ventilation und als Vergleichsgruppe der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) von Tieren beider Genotypen unter dreistündiger normoxischer Ventilation ermittelt.

Von Minute -10 bis Minute 20 und von Minute 180 bis 196 wurde der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) zweiminütlich gemessen, im übrigen Versuchsverlauf fand die Bestimmung alle 10 Minuten statt (Abb. 24).

3. 9. 1 Dreistündige hypoxische Ventilation

Der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) nach Umstellung auf hypoxische Ventilation lag initial bei den Wildtypen bei $1,3 \pm 0,2$ mmHg, bei den SDHD +/- Tieren lag er bei $1,1 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6) (Abb. 24). Unter fortgesetzter hypoxischer Beatmung fiel der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) ab, bei den Wildtypen lag das Minimum bei Minute 120 bei einem Wert von $0,4 \pm 0,1$ mmHg, die genetisch veränderten SDHD +/- Tiere erreichten ein Minimum bei Minute 60 mit einem Wert von $0,6 \pm 0,1$ mmHg. Von diesen Werten aus stiegen die pulmonalarteriellen Druckunterschiede (Δ PAP) bis zur Beendigung der hypoxischen Beatmungsphase in der 180sten Minute an. Die erreichten Endwerte lagen bei $0,5 \pm 0,2$ mmHg für die Wildtypen und bei $0,9 \pm 0,2$ mmHg für die SDHD +/- Tiere. In Minute 180 wurde die hypoxische Beatmung wieder auf normoxische Beatmung umgestellt. Der daraufhin abfallende pulmonalarterielle Druckunterschied lag bei den Wildtypen bei Minute 194 bei $-0,1 \pm 0,2$ mmHg, bei den SDHD +/- Tieren bei $0,4 \pm 0,1$ mmHg (jeweils n=6) (Abb. 24).

3. 9. 2 Dreistündige normoxische Ventilation

Bei den normoxisch ventilierten Lungen blieb der pulmonalarterielle Druckunterschied weitgehend konstant. Vom Zeitpunkt Null an erreichten die Wildtypen ihren mittleren Tiefstwert mit $-0,1 \pm 0,3$ mmHg in Minute 100 (Abb. 24). In Minute 196 lag der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) bei $0,4 \pm 0,3$ mmHg (n=5). Die SDHD +/- Tiere erreichten den tiefsten pulmonalarteriellen Druckunterschied von $-0,3 \pm 0,1$ mmHg in der 70sten Minute. In Minute 196 lag der pulmonalarterielle Druckunterschied (Δ PAP) bei $0,2 \pm 0,1$ mmHg (n=5) (Abb. 24).

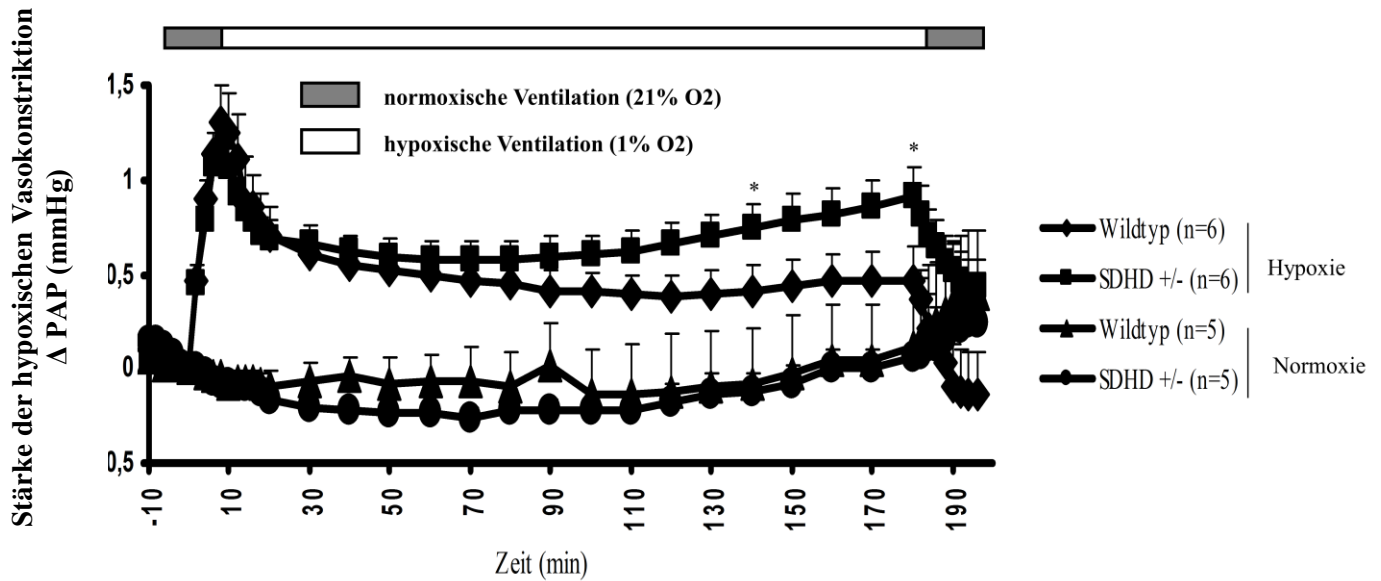


Abb. 24 Pulmonalarterieller Druckunterschied (Δ PAP) unter dreistündiger hypoxischer (1% O₂) oder normoxischer Ventilation (21% O₂)

Messung des pulmonalarteriellen Druckunterschieds (Δ PAP) unter dreistündiger hypoxischer Ventilation beider Genotypen im Vergleich zu dreistündiger normoxischer Beatmung. Signifikante Unterschiede lagen zwischen den beiden Genotypen unter hypoxischer Beatmung in Minute 140 und 180 vor; sie sind mit * gekennzeichnet.

3. 10 Versuchsergebnisse von SDHD+/- Tieren und Wildtypen beider Haltungsförmn mit histologischer Auswertung der Vaskularisierungsgrade

3. 10. 1 Hämatokritwerte der Tiere

Zum Versuchsablauf siehe Kapitel 2. 6. 3. 2

Nach drei Wochen hypoxischer bzw. normoxischer Haltung hatten die normoxisch gehaltenen Wildtypen einen durchschnittlichen Hämatokritwert von $36,6 \pm 0,6\%$ (n=5), während die SDHD +/- Tiere der gleichen Gruppe bei einem Wert von $34,3 \pm 1,4\%$ lagen (n=6) (Abb. 25). Die hypoxisch gehaltenen Tiere hatten signifikant höhere Hämatokritwerte als ihre normoxischen Vergleiche. Der Wert für die Wildtypen lag bei $63,2 \pm 2,8\%$ (n=6), die SDHD +/- Tiere hatten einen Hämatokritwert von $68,2 \pm 1,6\%$ (n=5) (Abb. 25).

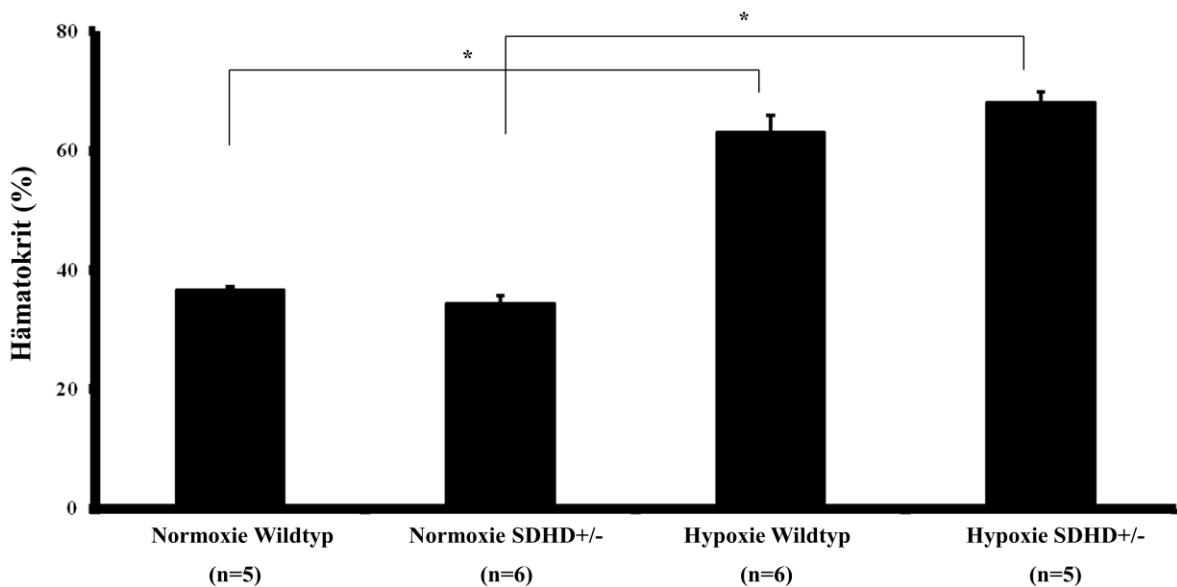


Abb. 25 Hämatokritwerte der normoxisch (21% O₂, normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O₂, normobar) gehaltenen Wildtypen und SDHD +/- Tiere

Darstellung der Hämatokritwerte der Versuchstiere beider Genotypen nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronisch hypoxischer (10% O₂) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 2 Messung des rechtsventrikulären Drucks

Zum Versuchsablauf siehe Kapitel 2. 6. 2. 4

Die normoxisch gehaltenen Wildtypen hatten nach drei Wochen einen rechtsventrikulären Druck von $26,8 \pm 0,6\text{mmHg}$ (n=5), während sich bei den haltungsgleichen SDHD +/- Tiere eine rechtsventrikulären Druck von $23,7 \pm 1,0\text{mmHg}$ messen ließ (n=6) (Abb. 26). Die unter Hypoxie gehaltenen, genetisch unveränderten Tiere hatten einen rechtsventrikulären Druck von $32,7 \pm 1,2\text{mmHg}$ (n=6), die haltungsgleichen SDHD +/- Tiere hatten einen Wert von $32,8 \pm 1,3\text{mmHg}$ (n=5). Die Werte der beiden Genotypen aus den verschiedenen Haltungsarten waren signifikant voneinander verschieden (Abb. 26).

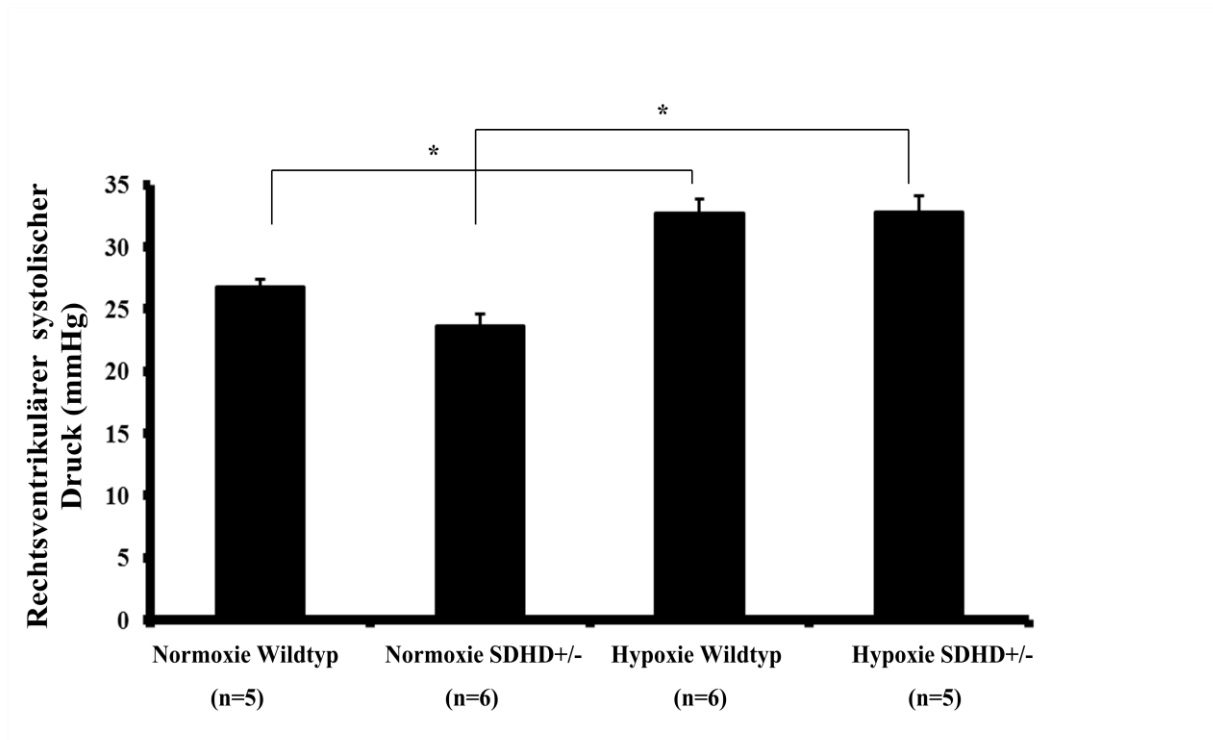


Abb. 26 Rechtsventrikulärer Druck der normoxisch (21% O₂, normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O₂, normobar) gehaltenen Mäuse beider Genotypen
 Druckverhältnisse im rechten Ventrikel der Tiere nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 3 Gewicht des rechten und linken Ventrikels inkl. Septum

Zur Versuchsbeschreibung siehe Kapitel 2. 6. 4

Rechter Ventrikel:

Der Wert der normoxisch gehaltenen Wildtypen für das Gewicht des rechten Ventrikels lag bei $6,0 \pm 0,5\text{mg}$ (n=5), der der normoxisch gehaltenen SDHD +/- Tiere lag bei $6,3 \pm 0,4\text{mg}$ (n=6). Bei den hypoxisch gehaltenen Tieren lagen die Gewichte der rechten Ventrikel höher, bei den Wildtypen bei $8,4 \pm 0,6\text{mg}$ (n=6), bei den genetisch veränderten Tieren bei $8,6 \pm 0,5\text{mg}$ (n=5) (Abb. 27).

Linker Ventrikel inklusive Septum ventriculi:

Bei den normoxisch gehaltenen Wildtypen lag das Gewicht bei $23,2 \pm 1,3\text{mg}$ (n=5), bei den SDHD +/- Tieren betrug es $23,1 \pm 0,6\text{mg}$ (n=6). Bei den hypoxisch gehaltenen Wildtypen lag das Gewicht bei $18,8 \pm 0,7\text{mg}$ (n=6), bei den SDHD +/- Tieren bei $22,5 \pm 1,3\text{mg}$ (n=5) (Abb. 27).

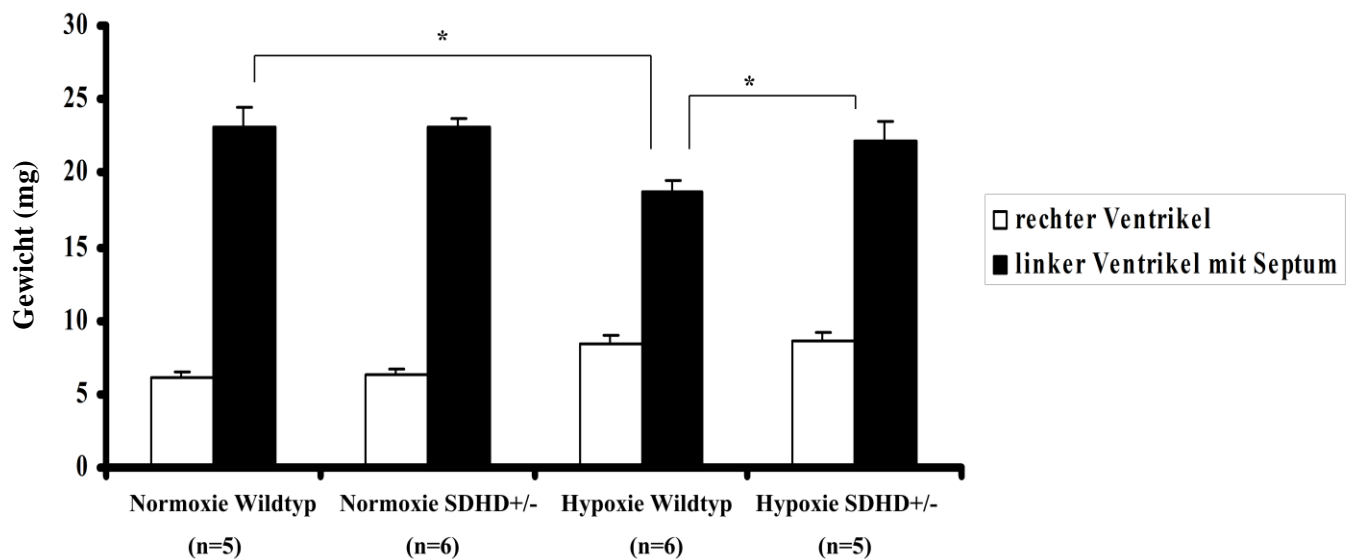


Abb. 27 Herzgewichte des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels inklusive Septum ventriculi von normoxisch (21% O₂, normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O₂, normobar) gehaltenen Mäusen
Dargestellt ist das Gewicht des rechten Ventrikels bzw. des linken Ventrikels mit intraventrikulärem Septum der Tiere nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 4 Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum linken Ventrikel

Als Index für eine Rechtsherzhypertrophie wurde der Quotient aus dem Gewicht des rechten im Verhältnis zum linken Ventrikel mit Septum berechnet. Die sich ergebenden Werte stellten sich folgendermaßen dar (Abb. 28): für die normoxisch gehaltenen Wildtypen ein Quotient von $0,3 \pm 0,02$ (n=5), für die SDHD +/- Tiere ein Quotient von $0,3 \pm 0,02$ (n=6). Für die Wildtypen aus hypoxischer Haltung lag das Verhältnis bei $0,5 \pm 0,03$ (n=6), für die genetisch veränderten Mäuse aus dieser Haltung lag es bei $0,4 \pm 0,004$ (n=5) (Abb. 28).

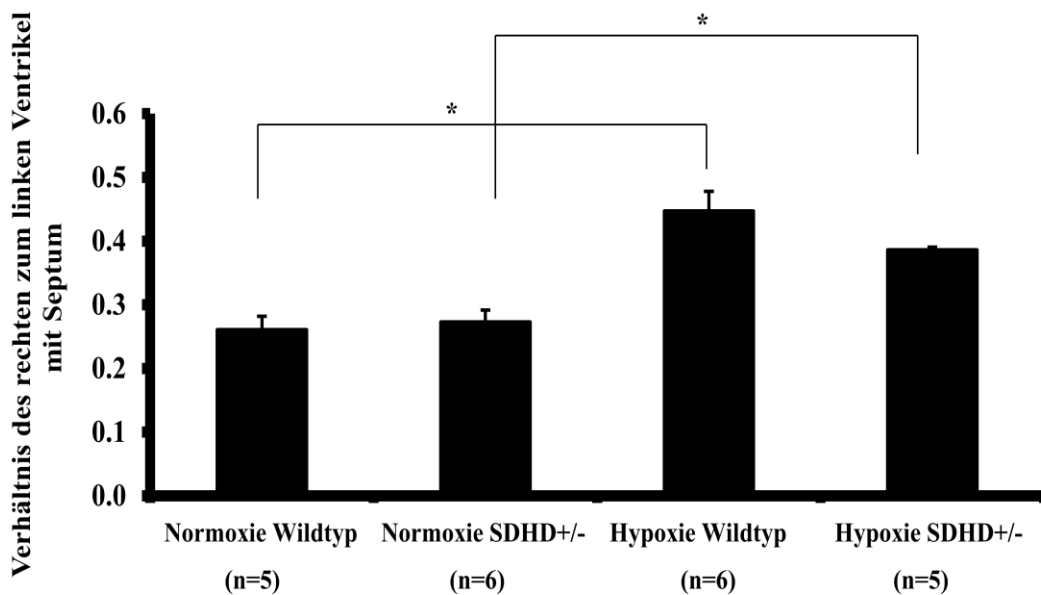


Abb. 28 Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel mit Septum ventriculi von normoxisch (21% O₂, normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O₂, normobar) gehaltenen Mäusen

Dargestellt ist das Verhältnis des Gewichts des rechten zum linken Ventrikel mit intraventrikulärem Septum der Tiere nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 5 Differenz im Körpergewicht der Tiere beider Haltungsformen

Die unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Wildtypen zeigten nach drei Wochen eine Zunahme des Körpergewichts von durchschnittlich $3,6 \pm 0,8\text{g}$ bei einem Ausgangsgewicht von $22,1 \pm 1,3\text{g}$ und einem Endgewicht von $25,7 \pm 0,8\text{g}$ (n=5) (Abb. 29). Die SDHD +/- Tiere lagen mit einer Gewichtszunahme von $2,5 \pm 0,3\text{g}$ im Mittel unter diesem Wert bei einem Ausgangsgewicht von durchschnittlich $28,2 \pm 1,7\text{g}$ und einem Endgewicht von $30,8 \pm 1,9\text{g}$ (n=6). Unter hypoxischen Haltungsbedingungen nahmen die Wildtypen im Mittel um $0,8 \pm 0,6\text{g}$ an Gewicht zu (n=6). Das Ausgangsgewicht lag im Durchschnitt bei $20,7 \pm 1,3\text{g}$, das Endgewicht bei $21,5 \pm 1,2\text{g}$. Die SDHD +/- Tiere verloren unter hypoxischer Haltung um $-1,6 \pm 1,5\text{g}$ an Gewicht, das Ausgangsgewicht lag im Durchschnitt bei $28,6 \pm 2,7\text{g}$, das Endgewicht bei $27,0 \pm 1,5\text{g}$ (n=5). Eine signifikante Differenz lag zwischen den SDHD +/- Tieren der beiden

verschiedenen Haltungsformen vor, die hypoxische Haltung führte hier zu einer signifikant geringeren Gewichtszunahme bzw. zu einem Gewichtsverlust der Tiere (Abb. 29).

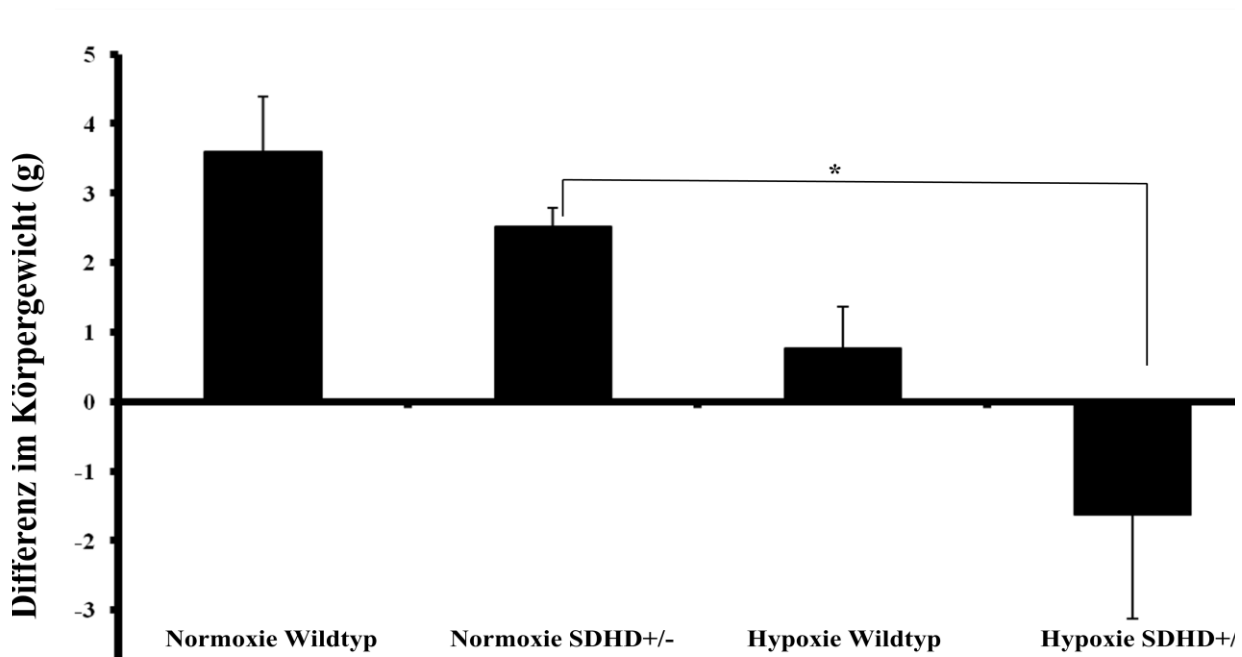


Abb. 29 Differenz im Körpergewicht der Tiere nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung

Dargestellt ist die Differenz im Körpergewicht der Tiere nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 6 Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht

Bei der Berechnung des Verhältnisses des Gewichts des rechten Ventrikels zum Körpergewicht der Tiere ergab sich für die normoxisch gehaltenen Wildtypen ein Quotient von $0,00023 \pm 0,00002$ (n=5), für die entsprechenden SDHD +/- Tiere lag der Wert bei $0,00021 \pm 0,00002$ (n=6) (Abb. 30). Aus der hypoxischen Haltung stammende Wildtypen erreichten einen Wert von $0,00040 \pm 0,00002$ (n=6), SDHD +/- Tiere lagen bei $0,00032 \pm 0,00001$ (n=5). Signifikante Differenzen zwischen diesen Werten lagen jeweils zwischen den gleichen Genotypen aus den beiden unterschiedlichen

Haltungstypen und bei den hypoxisch gehaltenen Gruppen beiden Genotypen vor (Abb. 30).

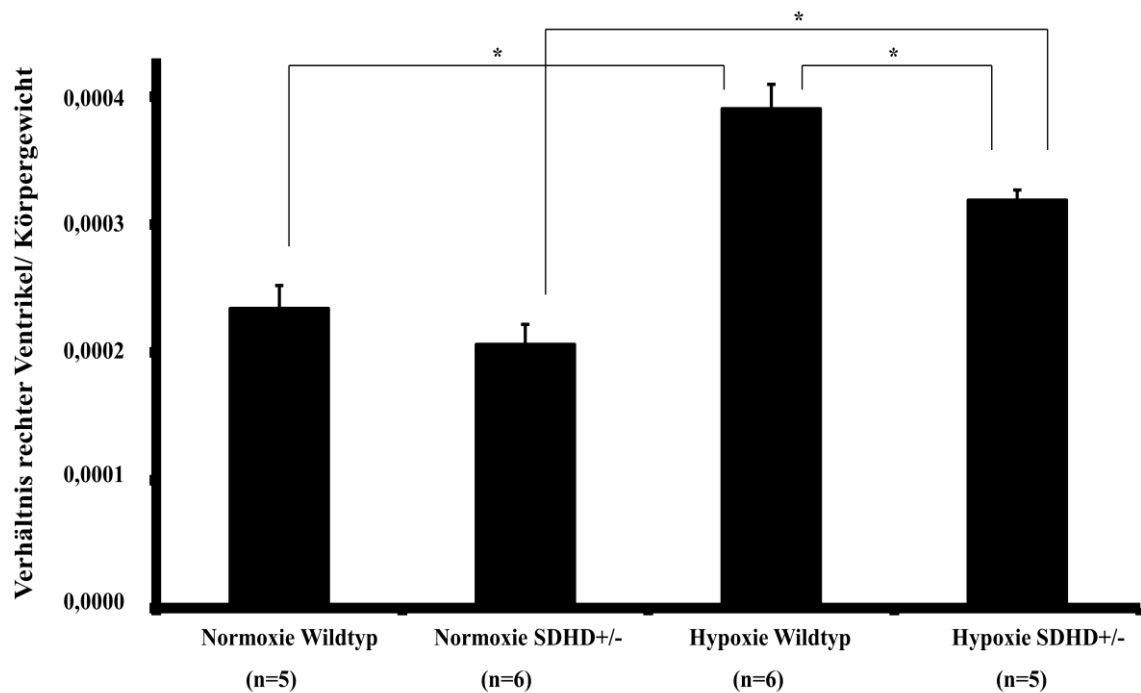


Abb. 30 Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zum Körpergewicht von normoxisch (21% O₂, normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O₂, normobar) gehaltenen Mäusen

Dargestellt ist das Gewicht des rechten Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere nach normoxischer (21% O₂, normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 7 Histologische Auswertung

Versuchsbeschreibung Kapitel 2. 6. 5. und 2. 6. 6

In der histologischen Auswertung der Versuche wurden die Gefäße in drei Größen eingeteilt und mit der unter (2. 6. 6) beschriebenen Methode ausgewertet. Hierbei wurden die Muskularisierungsgrade der Gefäße bestimmt und als „voll muskularisiert“, „teilmuskularisiert“ und „nicht muskularisiert“ definiert.

3. 10. 7. 1 Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70µm)

Normoxisch gehaltene Wildtypen zeigten $1,0 \pm 0,4\%$ nicht muskularisierte, $84,8 \pm 2,4\%$ teilmuskularisierte und $14,6 \pm 2,5\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=5). Normoxisch

gehaltene SDHD +/- Tiere hatten in der Auswertung $1,5 \pm 0,7\%$ nicht muskularisierte, $85,5 \pm 2,1\%$ teil- und $11,2 \pm 1,6\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=6) (Abb. 31).

Bei Wildtypen nach chronischer hypoxischer Haltung ergab die Auszählung $2,3 \pm 0,8\%$ nicht muskularisierte, $71,7 \pm 2,0\%$ teilmuskularisierte und $26,0 \pm 2,1\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=6). Hypoxisch gehaltenen SDHD +/- Tiere hatten einen Anteil an nicht muskularisierten Gefäßen von $2,8 \pm 0,7\%$ an teilmuskularisierten Gefäßen von $75,8 \pm 2,7\%$ und an voll muskularisierten Gefäßen von $21,4 \pm 2,6\%$ (n=5). Die Tiere aus hypoxischer Haltung zeigten signifikant mehr voll muskularisierte kleine Gefäße als die Tiere aus normoxischer Haltung, sie zeigten entsprechend signifikant weniger teilmuskularisierte Gefäße (Abb. 31).

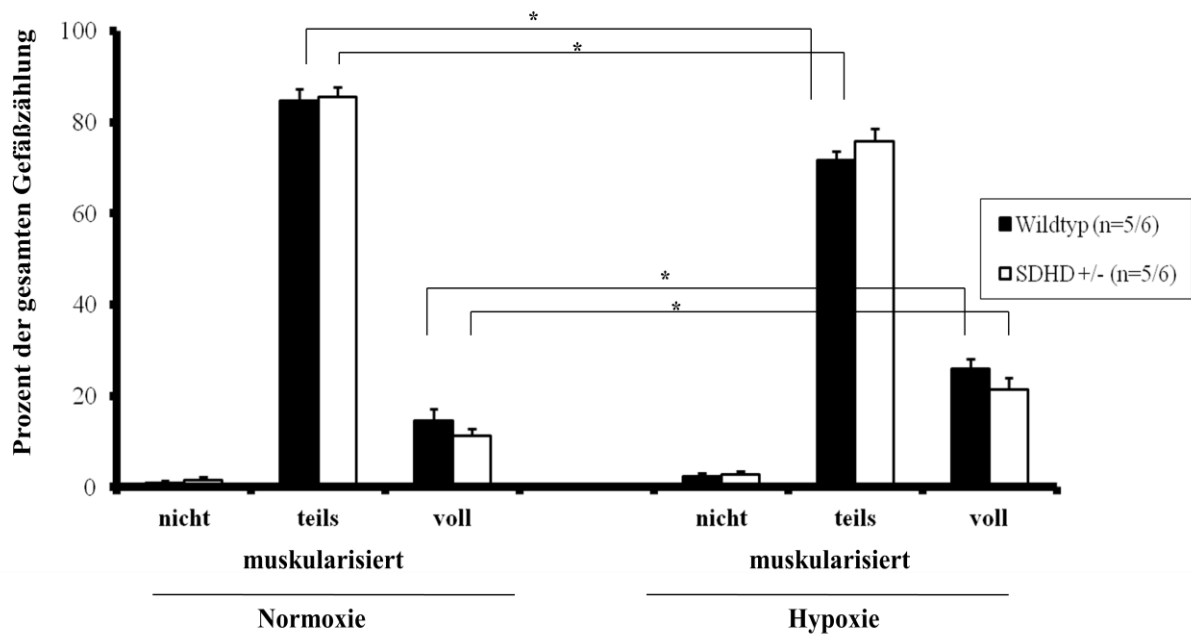


Abb. 31 Muskularisierungsgrad kleiner Gefäße (20- 70µm)

Muskularisierungsgrad der Gefäße von 20-70µm der Wildtypen und SDHD +/- Mäuse nach normoxischer (21%O₂, normobar) oder chronisch hypoxischer (10%O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 7. 2 Muskularisierungsgrad der mittleren Gefäße (>70-150µm)

Normoxisch gehaltenen Wildtypen erreichten bei Gefäßen zwischen >70 und 150µm einen Muskularisierungsgrad von $3,6 \pm 2,4\%$ nicht muskularisierten, von $58,4 \pm 14,9\%$ teil-muskularisierten und von $38,0 \pm 15,9\%$ voll muskularisierten Gefäßen (n=5) (Abb.

32). Die entsprechend gehaltenen SDHD +/- Tiere hatten 0,0% nicht muskularisierte Gefäße, $47,5 \pm 4,4\%$ teilmuskularisierte und $52,5 \pm 4,4\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=6). Die genetisch unveränderten Tiere aus chronischer Hypoxie hatten ebenfalls 0,0% nicht muskularisierte Gefäße, $55,2 \pm 5,0\%$ teilmuskularisierte und $44,8 \pm 5,0\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=6). Genetisch veränderte Tiere aus dieser Haltung hatten in dieser Gefäßgröße $1,2 \pm 1,2\%$ nicht muskularisierte, $46,4 \pm 7,6\%$ teil- und $52,4 \pm 7,2\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=5) (Abb. 32).

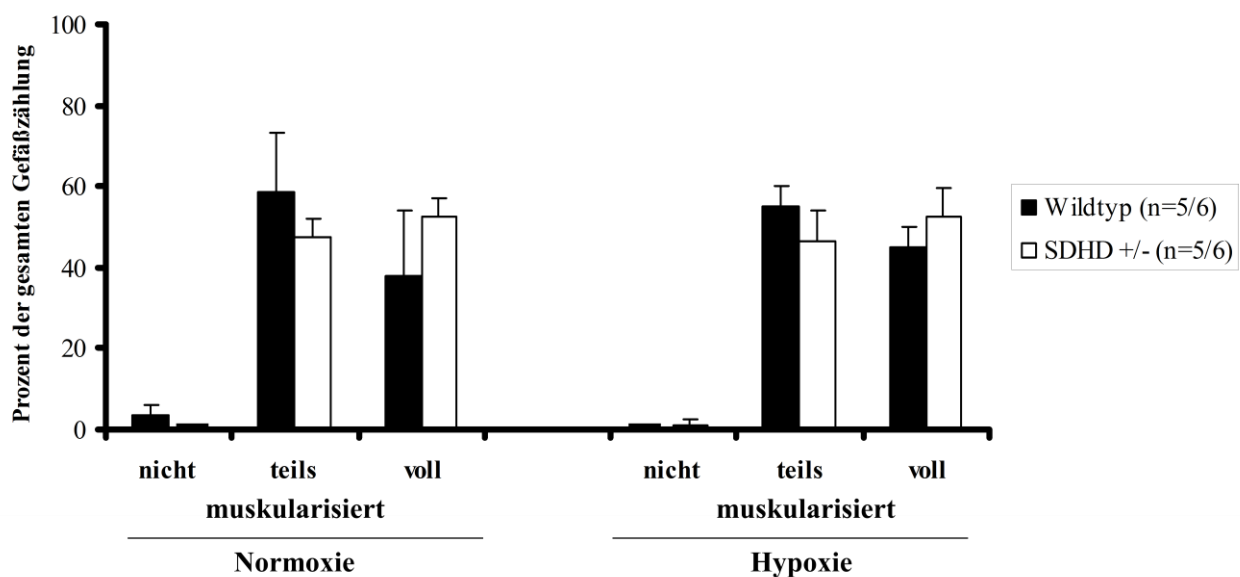


Abb. 32 Muskularisierungsgrad mittlerer Gefäße (> 70- 150µm)

Muskularisierungsgrad der Gefäße von > 70-150µm der Wildtypen und SDHD +/- Mäuse nach normoxischer (21%O₂, normobar) oder chronisch hypoxischer (10%O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

3. 10. 7. 3 Muskularisierungsgrad der großen Gefäße (> 150µm)

Normoxisch gehaltene Wildtyp Mäuse hatten bei Gefäßen über 150µm 0,0% nicht muskularisierte, $9,0 \pm 5,6\%$ teilmuskularisierte und $91,0 \pm 5,6\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=5) (Abb. 33). Die SDHD +/- Tiere hatten in der Auswertung ebenfalls 0,0% nicht muskularisierte, dann $4,2 \pm 4,2\%$ teilmuskularisierte und $95,8 \pm 4,2\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=6).

Nach hypoxischer Haltung hatten die Wildtypen 100% voll muskularisierte Gefäße entwickelt (n=6), die SDHD +/- Tieren wiesen 0,0% nicht muskularisierten Gefäße, $2,2 \pm 2,2\%$ teilmuskularisierte und $97,8 \pm 2,2\%$ voll muskularisierte Gefäße (n=5) auf (Abb. 33).

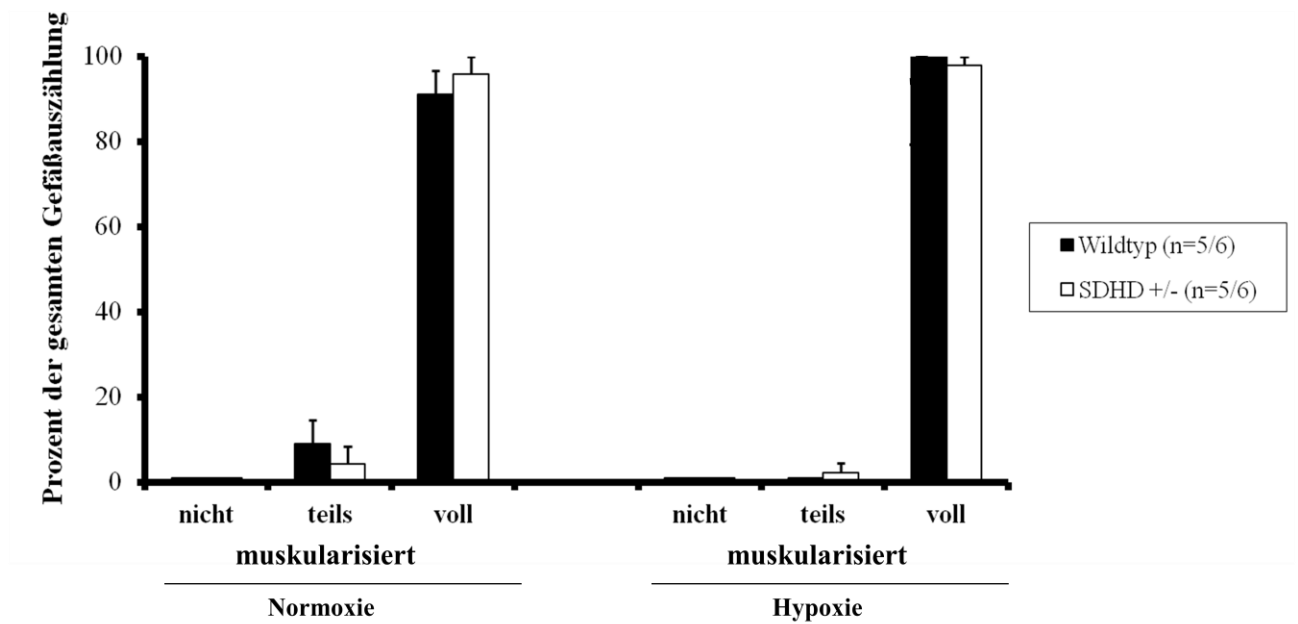


Abb. 33 Muskularisierungsgrad großer Gefäße (> 150µm)

Muskularisierungsgrad der Gefäße von > 150µm der Wildtypen und SDHD +/- Mäuse nach normoxischer (21%O₂, normobar) oder chronisch hypoxischer (10%O₂, normobar) Haltung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

4) Diskussion

1946 beschrieben von Euler und Liljestrand die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) [1]. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt [3]. Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist eine klinische Diagnose, die sich durch eine präkapilläre pulmonale Hypertonie stellen lässt, definiert durch einen mittleren PAP von $\geq 25\text{mmHg}$, sowie einen pulmonalarteriellen Verschlussdruck von $\leq 15\text{mmHg}$ und normale bis reduzierte CO-Werte ohne das Vorkommen einer anderen zugrunde liegenden Erkrankung [6].

Die Effekte der Hypoxie auf die pulmonalarteriellen Gefäße können in zwei bzw. drei zeitlich zu unterscheidende Prozesse eingeteilt werden [8], [9]:

- 1) akute Vasokonstriktion innerhalb von Sekunden nach Einsetzen einer Hypoxie, mit einem Druckmaximum in der 4. - 6. Minute,
- 2) verlängerte hypoxische Vasokonstriktion, Minuten bis zu Stunden nach Einsetzen der Hypoxie, in Form einer biphasischen Vasokonstriktion mit anfänglich akuter Vasokonstriktion, folgender mäßiger Dilatation und erneuter langsam progredienter Vasokonstriktion,
- 3) multifaktorieller Gefäßumbauprozess unter generalisierter chronischer Hypoxie, der zu einer permanenten Einengung des vaskulären Lumens führt und so eine pulmonale Hypertonie „fixiert“.

Es gibt zahlreiche Ansätze, die sich mit dem der HPV zugrunde liegenden Mechanismus auseinandersetzen. Unter anderem gilt die Aufmerksamkeit den NAD(P)H-Oxidasen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einem möglichen mitochondrialen Sauerstoffsensing [3]. In der vorliegenden Arbeit wurde am Mausmodell auf der Ebene der mitochondrialen Atmungskette ein möglicher Sauerstoffsensor für die HPV untersucht. Es wurden Mäuse verwendet, die sich durch ein Gendefizit auszeichneten, welches die SDH-Untereinheit D betraf. Die Tiere waren heterozygot gendefizient, da homozygote SDHD -/- Tiere in utero verstarben. Die Untereinheit D der SDH dient in der Atmungskette unter anderem zur Verankerung des Komplex II in die Mitochondrienmembran. Dysfunktionen der SDHD führen zu Fehlfunktionen des gesamten Komplex II der Atmungskette [104], [105]. Piruat et al. legten dar, dass der beschriebene Gendefekt die Funktion der SDH, dem heterozygoten Defekt entsprechend, um 50% reduziert [91]. Kongenitale Gegenregulationsmechanismen, die die Reaktion der intraazinären Gefäße und größeren

Gefäße auf die HPV beeinflussen könnten sind jedoch nicht mit letztendlicher Sicherheit auszuschließen.

Die verwendeten Mäuse boten die Möglichkeit, die Rolle eines funktionsfähigen Komplex II der Atmungskette für die HPV zu untersuchen, ohne dabei möglichen Nachteilen chemischer Inhibitoren Rechnung tragen zu müssen, die unter den vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen waren [32], [39], [40]. Vorangegangene Versuche mit chemischen Inhibitoren der SDHD haben eine mögliche Beteiligung des Enzyms an der HPV vermuten lassen. Hier sind insbesondere auch Versuche mit Succinat, dem Substrat der Fumarat-Reduktase und somit einem Inhibitor der hypoxischen Enzymreaktion des Komplex II als Fumarat-Reduktase erwähnenswert. Paddenberg et al. konnten anhand quantitativer Analysen von Gefäßmuskelzellen aus murinen Lungen demonstrieren, dass die Zugabe von Succinat die Anzahl der ROS-produzierenden Zellen unter hypoxischen, aber nicht unter normoxischen Bedingungen reduziert. Als Quelle der ROS konnten in dieser Studie die Mitochondrien identifiziert werden. Komplex II spielte in der ROS-Produktion unter hypoxischen Bedingungen in seiner katalytischen Aktivität als Fumarat-Reduktase eine große Rolle, während Komplex I und III die ROS-Produktion unter normoxischen Bedingungen maßgeblich beeinflussten [69].

Wie bei allen Tiermodellen muss hinterfragt werden, inwiefern sich die erhobenen Daten auf die menschliche Physiologie übertragen lassen. Obwohl diese Frage sich nicht abschließend beantworten lässt, haben Tierexperimente bereits wesentliche Daten für das grundlegende Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des Menschen geliefert, insbesondere im Hinblick auf die pulmonale Hypertonie [17], [106]. Der Versuch an Mäusen bietet eine Vielfalt an Forschungsoptionen, die so nur am Tiermodell darstellbar sind, insbesondere die in dieser Arbeit genutzte Möglichkeit der Untersuchung genetisch veränderter Tiere.

Die Verwendung von Mäuselungen im Modell der isoliert perfundierten Lunge unter akuter und prolongierter Hypoxie und in histologischer Betrachtung nach chronischer Hypoxie erlaubt, sich mit den beschriebenen Aspekten der hypoxischen Effekte im Detail auseinanderzusetzen [8], [9].

4. 1 Die isoliert perfundierte Lunge

Das System der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge ermöglicht die direkte Beurteilung des Gefäßwiderstands und somit der physiologischen Reaktion der

Lungengefäße auf eine Änderung des Sauerstoffgehalts in der Ventilationsluft. In den gefäßseitig gespülten Lungen wurde während der Versuche die Versorgung der Zellen durch die Verwendung von Krebs-Henseleit-Puffer sichergestellt. Krebs-Henseleit-Puffer hat sich als zuverlässiges Medium für diese Versuchskonstellation bewährt [99]. Die Temperatur der Perfusionslösung und der Gewebe wurde während der Versuche auf physiologischem Niveau konstant gehalten. Das Gewicht der Lungen wurde zur Früherkennung eines Ödems ständig gemessen. Als möglicher Nachteil dieses Modells ist unter anderem die Perfusion der Gewebe zu erwähnen, die der physiologischen Perfusion mit Blut nachempfunden ist, jedoch z.B. keine Möglichkeit zur „physiologischen Entsorgung“ anfallender Stoffe, z. B. über die Leber, bietet. Die gründliche Spülung der Lungen vor Versuchsbeginn diente dazu, in den Gefäßen vorhandene Stoffe und Zellen soweit möglich auszuspülen. Dies ist aber vor allem bei adhäsionsstarken Zellen wie z.B. Thrombozyten nur bedingt möglich. Insgesamt ist dieser Effekt laut vorangehenden Studien zu dieser Thematik jedoch als gering einzuschätzen [107], [108].

Der Vorteil des Modells gegenüber Methoden, in denen einzelne Zellen oder Zellverbände untersucht werden, liegt in der Nähe zur ursprünglichen Physiologie des Organs. Die in dieser Studie verwendeten genetisch veränderten Tiere eröffnen zudem die Möglichkeit, trotz der Versuche am komplexen System des Organs, einen Einblick in die Bedeutung eines einzelnen Enzyms zu gewinnen. Allerdings ist auch anzumerken, dass die Betrachtung der Lunge als physiologische Einheit keine detaillierte Analyse einzelner Bestandteile, wie z.B. einzelner Gefäßgrößen-Kategorien oder anderer anatomischer Untereinheiten wie z.B. den Azini zulässt. Die gemessenen Werte repräsentieren die Summe des Zusammenwirkens aller anatomischen und physiologischen Untereinheiten der Lungen.

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Haltung von Versuchsgruppen unter hypoxischen Bedingungen, die eine Beurteilung des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstands auf akut induzierte Hypoxie nach vorhergehendem Gefäßremodelling durch chronische Hypoxie zuließ. In der Versuchskonstellation wurden Tiere beider Genotypen über drei Wochen unter hypoxischen Bedingungen normobar bei 10% Sauerstoff gehalten.

Nach normoxischer Tierhaltung ergab sich unter akuter Hypoxie zwischen Wildtyp Tieren und SDHD +/- Tieren kein signifikanter Unterschied in der Stärke der pulmonalarteriellen Vasokonstriktion (Abb. 11, 15 und 23). Nach chronisch hypoxischer Haltung reagierten die Wildtyp Tiere in der zweiten Hypoxiephase mit

einer signifikant geringer ausgeprägten hypoxischen Vasokonstriktion als die aus normoxischer Haltung stammenden Vergleichstiere. Für die SDHD +/- Tiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede nach chronischer hypoxischer Haltung (Abb. 11, 15 und 23). Für die Reduktion der HPV nach chronischer Hypoxie bei den Wildtypen können die verschiedenen Umbau- und Anpassungsmechanismen der Gefäße an die chronische Hypoxie ursächlich sein [11], [12]. Die Tatsache, dass sich bei den genetisch veränderten Tieren keine signifikante Reduktion nachweisen ließ, ist also insofern interessant, als die Kapazität zur hypoxischen Vasokonstriktion nach chronischer Hypoxie durch die SDHD +/- Mutation beeinflusst worden sein kann. Die pulmonalarteriellen Ausgangsdruckwerte vor der jeweiligen Hypoxiephase lagen in den hypoxisch gehaltenen Gruppen erwartungsgemäß als Ausdruck der chronischen pulmonalen Hypertonie signifikant höher (Abb. 12 und 16).

In der durch U-46619 induzierten Vasokonstriktion lag die Stärke des pulmonalarteriellen Druckanstiegs in den Tieren aus chronischer hypoxischer Haltung signifikant über dem der normoxisch gehaltenen Tiere (Abb. 13, 15 und 23). Ebenfalls signifikant verstärkt war die pulmonalarterielle Vasokonstriktion auf U-46619 im Verhältnis zur HPV bei hypoxisch gehaltenen Tieren beider Genotypen (Abb. 15, signifikant für beide Gruppen in Abb. 23). Denkbar ist, dass die hypoxisch gehaltenen Tiere z. B. eine höhere Konzentration an NO im Gewebe vorweisen, sodass die HPV weniger stark ausgeprägt ist als nach normoxischer Haltung (s. oben), während die Vasokonstriktion auf U-46619, die offenbar zumindest partiell über andere Signalwege läuft als die durch Hypoxie induzierte, im Verhältnis mit einem signifikant höheren Druckunterschied abläuft [109], [110].

Es stellt sich zwischen den Gruppen aus normoxischer Haltung eine nicht signifikante Tendenz dar, in der die SDHD +/- Tiere im Gegensatz zu den Wildtypen nicht mit einem stärkeren pulmonalarteriellen Druckanstieg auf U-46619 reagieren, sondern der pulmonalarterielle Druckanstieg weniger stark ausgeprägt war als die HPV. Hier steht als Ursache die Überlegung im Raum, ob das Tromboxan-A₂-Analogon U-46619, welches über eine Blockierung von Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen im Sinne einer Vasokonstriktion wirken kann [111], deshalb bei den SDHD +/- Tieren keine größere Vasokonstriktion hervorruft als die akute Hypoxie. Hier wären weiterführende Versuche ideal, um die beschriebene Tendenz zu verifizieren. Betrachtet man die unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Tiere, so ist diese Tendenz zwischen Wildtypen und genetisch veränderten Tieren nicht mehr vorhanden. Hier reagieren alle Gruppen

mit einem signifikant höheren pulmonalarteriellen Druckanstieg auf U-46619 als auf die akute Hypoxie. Denkbar ist, wie oben angesprochen, dass dieser Effekt durch eine höhere NO-Konzentration im Gewebe chronisch hypoxisch gehaltener Tiere entsteht, der der HPV entgegenwirken würde [109], [110], allerdings ist dies nur als Teilaspekt zu sehen, wenn man die Reaktionen der Lungen in Gegenwart von L-NNA betrachtet: Die HPV ist nach Blockierung der NO-Synthetase durch L-NNA in den hypoxisch gehaltenen Tieren im Vergleich zu den normoxischen Gruppen signifikant vermindert (Abb. 17, 21 und 23), sodass eine höhere NO-Konzentration nach chronischer Hypoxie die beobachtete Tendenz nicht allein erklären kann. Ginge man allein von einem höheren Gehalt an NO als Ursache für die unterschiedliche HPV nach hypoxischer Haltung aus, so müsste die Zugabe von L-NNA einen erneuten Anstieg der HPV nach hypoxischer Haltung möglich machen, wie es als Reaktion auf U-46619 zu verzeichnen ist. Dass hier praktisch das Gegenteil der Fall ist, zeigt, von welcher Wichtigkeit das Verständnis der detaillierten Mechanismen der pulmonalen Vasokonstriktion zum Verständnis der gefundenen Tendenzen ist und wie komplex diese Signalwege also sind. Es ist auch ein möglicher Hinweis auf eine stärkere Abhängigkeit der HPV von NO als vasodilatorische Gegenregulation in Normoxie im Vergleich zu chronisch hypoxisch gehaltenen Tieren.

In der dreistündigen Hypoxiephase unter 1% O₂ (Abb. 24) war nach der anfänglichen Akutphase der HPV ein Abfall des pulmonalarteriellen Drucks und schließlich ein langsamer Anstieg zum Ende der drei Stunden bis Minute 180 zu verzeichnen, jedoch ohne die Stärke der akuten HPV zu erreichen. Es handelte sich um die unter 1. 3 beschriebene, biphasische Vasokonstriktion. Insgesamt zeigten die SDHD +/- Tiere unter Hypoxie nach der Akutphase tendenziell ein höheres Druckniveau als die Wildtypen. Die Schere zwischen den pulmonalarteriellen Drücken spaltete sich zum Ende der Hypoxiephase weiter auf und führte bei vergleichbaren Ausgangsdrücken zu erhöhten Endwerten in SDHD +/- Lungen. Das Verhalten der biphasischen Vasokonstriktion ist somit in beiden Genotypen im Prinzip vergleichbar, jedoch unter den SDHD +/- Tieren mit einem stärkeren pulmonalarteriellen Druckanstieg verbunden, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nur für zwei Punkte gegen Ende der Hypoxiephase zeigten. Dies spricht für die Bedeutung der SDH für eine Antagonisierung der Stärke der prolongierten HPV und somit für Unterschiede in den Regulationsmechanismen, die der akuten und prolongierten HPV zugrunde liegen.

Der Aktivitätsverlust des Komplexes II könnte in den Zellen zu einer Pseudohypoxie mit einer grundsätzlich gesteigerten Aktivität eines hypoxischen Signalwegs führen, z.B. über eine gesteigerte ROS-Bildung und somit eine HIF-Aktivierung [112]–[114]. Da der Komplex II der Atmungskette insbesondere unter hypoxischen Bedingungen zusätzlich zu den Komplexen I und III eine wichtige Rolle in der ROS-Produktion spielt [69], kann dies für die heterozygot SDHD defizienten Gewebe eine mangelnde Anpassungsfähigkeit an prolongierte Hypoxie bedeuten, da sie in der Ausgangssituation bereits von gesteigerter HIF-Aktivität beeinflusst werden, die die Gegenregulation zur hypoxischen Vasokonstriktion in der prolongierten Hypoxie erschwert.

4. 2 Diskussion zur histologischen Evaluation

Die Auswertungen der Gewebe nach chronischer Hypoxie erfasste eine Quantifizierung der Umbaumechanismen der pulmonalen Gefäße in SDHD +/- Tieren und Wildtypen nach generalisierter chronischer Hypoxie.

Die für diese Versuche verwendeten Tiere beider Genotypen wurden zuvor für drei Wochen unter hypoxischen Bedingungen normobar bei 10% Sauerstoff gehalten. Die entsprechenden Kontrolltiere wurden bei kontrollierter Gaszusammensetzung mit 21% Sauerstoff gehalten.

Der Hämatokrit (Abb. 25) lag bei den Tieren aus hypoxischer Haltung signifikant über dem der normoxisch gehaltenen Tiere. Dieser Anstieg des Hämatokrit war aufgrund des physiologischen Anstiegs der Erythropoetinproduktion bei einem verringerten Sauerstoffpartialdruck zu erwarten [115].

Es erfolgte das Auswiegen der rechten Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel der Tiere inklusive Septum (Abb. 27). Hier zeigte sich, dass die linken Ventrikel mit Septum der hypoxisch gehaltenen Wildtiere signifikant leichter waren als die der normoxisch gehaltenen Tiere. Zwischen den beiden Haltungstypen der SDHD +/- Tiere und zwischen den Gewichten der rechten Ventrikel lagen keine signifikanten Gewichtsunterschiede vor. Dies ist allerdings nur bei den absoluten Gewichten der Fall, die deutlich weniger aussagekräftig sind als der Vergleich zwischen dem rechten Ventrikel im Verhältnis zum linken Ventrikel mit Septum (Abb. 28) und dem Vergleich zwischen dem Gewicht des rechten Ventrikels und dem Körpergewicht (Abb. 30). Die Tiere aus hypoxischer Haltung zeigten hier im Verhältnis des rechten zum linken Ventrikel mit Septum signifikant höhere Werte als die normoxisch gehaltenen

Vergleichstiere. Im Verhältnis zum Körpergewicht, welches bei den hypoxisch gehaltenen SDHD +/- Tieren signifikant unter dem der normoxisch gehaltenen SDHD +/- Mäuse lag (Abb. 29), zeigten Tiere beider Genotypen ebenfalls ein signifikant erhöhtes Verhältnis. Diese Unterschiede sprechen für die Ausbildung eines Cor pulmonale der hypoxisch gehaltenen Tiere mit entsprechender Hypertrophie des rechten Ventrikels, wenn auch die linken Ventrikel der Wildtyp-Tiere unter chronischer Hypoxie etwas an Gewicht verloren; ein Effekt, der sich bei den genetisch veränderten Tieren nicht zeigte (Abb. 27). Offensichtlich sind die SDHD +/- Tiere vor diesem Gewichtsverlust des linken Ventrikels unter Hypoxie geschützt.

Konform mit der Rechtsherzhypertrophie war zu beobachten, dass bei der Messung des rechtventrikulären Drucks die hypoxisch gehaltenen Tiere, Wildtypen wie SDHD +/- Tiere, einen signifikant höheren Druck im rechten Ventrikel aufwiesen, als die normoxisch gehaltenen Tiere (Abb. 26). Unterschiede zwischen den beiden Genotypen der gleichen Haltung waren nicht nachzuweisen. Die Ausbildung eines Cor pulmonale und der damit einhergehend erhöhte Druck im rechten Ventrikel der hypoxisch gehaltenen Tiere ist als Folge der pathophysiologischen Umbaumechanismen auf chronische Hypoxie zu werten.

Unter dem Mikroskop konnte durch die immunhistochemische Doppelfärbung gegen α -smooth-muscle-actin und von-Willebrand-Faktor als Endothelmarker der Muskularisierungsgrad der einzelnen pulmonalen Gefäße bestimmt werden. Durch die Unterteilung in die Größen 20-70 μ m (Abb. 31), >70-150 μ m (Abb. 32) und >150 μ m (Abb. 33) wurden die unterschiedlichen Gefäßkaliber im Hinblick auf ihr spezifisches Remodelling betrachtet.

In dieser histologischen Auswertung mithilfe der drei beschriebenen Gefäßgrößen fallen Gefäße, die intraazinär liegen und mit einer Gefäßgröße von 20-40 μ m zu bemessen sind, in die Kategorie der kleinen Gefäße von 20-70 μ m. Ein signifikanter Unterschied war in der Gefäßkategorie 20-70 μ m im Vergleich zwischen den beiden Haltungsförm in der Unterscheidung teilweise- und voll muskularisiert zu verzeichnen (Abb. 31). Erwartungsgemäß lag der Anteil der voll muskularisierten Gefäße bei den hypoxisch gehaltenen Tieren zulasten der teilweise muskularisierten Gefäße höher als in der Vergleichsgruppe aus normoxischer Haltung. Diese Beobachtung ist mit dem erhöhten rechtsventrikulären systolischen Druck der Tiere aus hypoxischer Haltung kongruent (Abb. 26) und stellt am ehesten die Anpassung der Gefäßstruktur nach hypoxischer Haltung im Sinne einer verstärkten Muskularisierung kleiner Gefäße dar [116], [117].

Tendenziell zeigten die SDHD +/- Tiere eine weniger starke volle Muskularisierung dieser kleinen Gefäße als die Wildtypen. Hier wären weiterführende Untersuchungen interessant, die sich insbesondere auf die Gefäßgröße 20-40µm bezieht, um Unterschiede im Vergleich zu Gefäßen größerer Durchmesser zu eruieren (vergleiche unten).

Die Gefäße mittlerer Größe (>70-150µm) zeigten diesen signifikanten Unterschied in den Muskularisierungsgraden nicht mehr, bei den großen Gefäßen (>150µm) lag das Verhältnis deutlich auf der Seite der vollen Muskularisierung (Abb. 32, 33). Als Ursache hierfür ist unter anderem die ohnehin verstärkte Muskularisierung von Gefäßen dieser Größenordnung zu sehen [118]. Hinzu kommt die Tatsache, dass es sich bei diesen Gefäßen nicht um Widerstandsgefäße handelt und sie den vaskulären Umbaumechanismen unter chronischer Hypoxie demzufolge nicht in dem Ausmaß unterliegen, das sich bei Widerstandsgefäßen zeigt.

Ergebnisse der Arbeitsgruppe Paddenberg et al. postulieren, dass sich gerade kleine intraazinär gelegenen Gefäße von 20-40µm Durchmesser in Tieren mit einem SDHD +/- Defekt unter Hypoxie anders verhalten als präazinäre Gefäße [119]. Gefäße, die im Durchmesser größer sind als 40µm, sind die Hauptverursacher des pulmonalen vaskulären Widerstands, sodass Veränderungen in der Stärke der Vasokonstriktion distal gelegener Gefäße im Model der isoliert perfundierten Lunge nicht erfasst werden können.

Paddenberg et al. (2012) haben die heterozygot SDHD-gendefizienten Mäusen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, anhand von videomorphometrischen Analysen von Gefäßen in Vibratomschnitten von 200µm Dicke untersucht. Diese Methodik lässt zu, direkt intraazinäre Arterien mit einem Durchmesser von 20-40µm zu untersuchen, indem die mit α -smooth-muscle-actin-Primärantikörper gefärbten Gefäße in einer Durchflussskammer videomorphometrisch unter dem Einfluss einer hypoxischen Umgebung bzw. unter den Einfluss verschiedener Substanzen beurteilt werden.

In den so durchgeführten Versuchen zeigte sich an SDHD +/- Tieren für intraazinär gelegene Gefäße ein Verlust der hypoxischen Kontraktion, während die in dieser Arbeit untersuchte Gesamteinheit der Lunge im Model der isoliert perfundierten Lunge in den SDHD +/- Tieren keinen signifikanten Unterschied in der HPV im Vergleich zu Wildtypen zeigten (Abb. 11, 15, 23). Komplex II ist somit insbesondere in Gefäßen von unter 40µm Durchmesser für die hypoxische Vasokonstriktion unabdingbar.

Insgesamt ist zu sagen, dass die SDHD für einen funktionsfähigen Komplex II der Atmungskette ausschlaggebend ist [91] und dass sie in funktionsfähiger Form für die HPV intraazinärer Gefäße benötigt wird [119]. Diese intraazinären Gefäße spielen eine Rolle für die Anpassung des Ventilations/-Perfusionsverhältnis, haben jedoch keine Auswirkung auf den in dieser Arbeit mittels dem Model der isoliert perfundierten Lunge untersuchten pulmonalarteriellen Druckunterschied, welcher von größeren Widerstandsgefäßen verursacht wird.

Somit ergibt sich, dass die durch Hypoxie induzierten Vorgänge in den pulmonalen Gefäßen im Bereich von verschiedenen Kategorien an Gefäßdurchmessern offenbar differentiell von einem intakten mitochondrialen Komplex II abhängig sind.

4. 3 Ausblick

Die Untersuchung der Mitochondrien und speziell der SDH in der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion und der chronisch hypoxischen pulmonalen Hypertonie sind wichtig zum besseren Verständnis und zur Differenzierung der Signaltransduktion und der Sensormechanismen, die diese Prozesse steuern.

Um speziell die Rolle der SDHD weiter aufzuschlüsseln, wäre das Züchten von Tieren wünschenswert, bei denen es möglich ist, das SDHD-Gen konditional an- bzw. auszuschalten. Auf diese Weise könnten möglicherweise auch homozygot gendefiziente SDHD $-/-$ Tiere untersucht werden, deren Züchtung zum jetzigen Zeitpunkt am Versterben der Tiere in utero scheitert. Eine SDHD $-/-$ Genvariante wäre in Versuchen im Vergleich zu heterozygot gendefizienten Mäusen durch den kompletten Mangel an physiologischer SDHD-Funktion den hier verwendeten Mäusen vorzuziehen. Durch das konditionale Ausschalten würden auch mögliche kongenitale Gegenregulationseffekte umgangen werden. Auch solche Gegenregulationseffekte könnten für die Unterschiede in der HPV-Beeinflussung durch SDHD in intraazinären oder größeren Gefäßen verantwortlich sein.

Des Weiteren wäre es wünschenswert, die Gefäßgrößen in der histologischen Evaluation nach chronisch hypoxischer Haltung zu variieren und insbesondere die intraazinären Gefäße von 20-40µm Größe im Hinblick auf ihren Muskularisierungsgrad zu beurteilen, um Unterschiede der HPV in verschiedenen Gefäßdurchmessern zu erfassen und Rückschlüsse in Hinsicht auf die Bedeutung der SDHD ziehen zu können.

Die weitere Erforschung der SDH könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der HPV als Ganzes und zum Verständnis ihrer Teilmechanismen und damit letztlich zur Prävention und kausal orientierten Therapie der pulmonalen Hypertonie und der gestörten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion leisten.

5) Zusammenfassung

Das Prinzip der der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) ist seit langem bekannt, ihr Mechanismus ist aber trotz intensiver Forschung bisher ungeklärt. Die HPV ist physiologisch für das pulmonale Ventilations-/Perfusionsverhältnis verantwortlich, chronische generalisierte Hypoxie führt zur Ausprägung einer pulmonalen Hypertonie mit einem vaskulären Umbauprozess. Unter Umständen ist die HPV für die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) mitverantwortlich, der Gefäßumbauprozess könnte jedoch auch von der HPV unabhängig stattfinden.

Die Succinatdehydrogenase (SDH), ein Enzym der mitochondrialen Atmungskette und des Zitratzyklus besteht aus vier Untereinheiten. Mitochondrien stehen derzeit als Sensor-Organellen der HPV und des Gefäßumbaus nach chronischer Hypoxie in der Diskussion.

In dieser Arbeit wurden Mäuse verwendet, die heterozygot für die Untereinheit D der SDH gendefizient sind. Daraus resultierte eine 50%ige Einschränkung der Funktionsfähigkeit der SDH, eine Hochregulation des verbliebenen Gens konnte im Vorfeld nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich um die bisher einzige Möglichkeit die Funktion der SHD in der HPV zu evaluieren, die nicht von einer pharmakologischen Intervention abhängt.

Das Modell der isoliert perfundierten Lunge bietet die Möglichkeit sich mit der aus dem Gesamtorganismus entfernten und somit von dessen Einflüssen unabhängigen und dennoch in ihrer physiologischen Reaktion weitgehend erhaltenen Lunge zu befassen. Am Modell der isoliert perfundierten Lunge wurden die Organe akuter Hypoxie oder dem Thromboxanalogon U-46619 ausgesetzt und der pulmonalarterielle Druckunterschied gemessen. Diese Versuche wurden an Tieren durchgeführt, die zuvor drei Wochen entweder unter normoxischen oder hypoxischen (10% Sauerstoff, normobar) Bedingungen gehalten worden waren. Die Versuche wurden in An- und Abwesenheit des Stickstoffmonoxid(NO)-Synthese-Inhibitors L-NG-Nitroarginin (L-NNA) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion der HPV nach chronischer Hypoxie in Anwesenheit von L-NNA im Vergleich zu den normoxisch gehaltenen Tieren beider Genotypen und im Vergleich zu einem U-46619 induziertem pulmonalen Druckanstieg, welcher nach chronischer Hypoxie stärker ausgeprägt war.

Die weist auf einen NO-unabhängigen Mechanismus der Herunterregulation der HPV unter chronischer Hypoxie hin. Jedoch ist hier kein Einfluss des Genotyps (Wildtyp vs. SDHD +/-) auf die HPV-Stärke detektierbar.

Weitere Versuche bezogen sich auf die Stärke der Vasokonstriktion unter prologierter hypoxischer Beatmung von Lungen beider Genotypen über drei Stunden. Die SDHD +/- Tiere zeigten am Ende der dreistündigen Hypoxiephase ein höheres Vasokonstriktionsniveau als die Wildtypen. Dies spricht für die Bedeutung der SDH für eine Antagonisierung der Stärke der prolongierten HPV und somit für Unterschiede in den Regulationsmechanismen, die der prolongierten hypoxischen Vasokonstriktion im Vergleich zur akuten hypoxischen Vasokonstriktion zugrunde liegen.

In den histologischen Auswertungen wurden die intrapulmonalen Gefäße und ihr Muskularisierungsgrad beurteilt. Die Lungen der zuvor drei Wochen unter hypoxischen (10% Sauerstoff, normobar) oder normoxischen Bedingungen gehaltenen Tiere wurden histologisch aufgearbeitet und die Gefäße in drei Größen unterteilt (20-70µm, >70-150µm und >150µm). Anschließend wurden die Gefäße der verschiedenen Durchmesser auf ihren Muskularisierungsgrad hin mikroskopisch analysiert. Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen, der Muskularisierungsgrad war jedoch in den kleinen Gefäßen nach hypoxischen Haltungsbedingungen höher.

Paddenberg et al. (2012) konnten zeigen, dass intraazinär gelegene Gefäße von 20-40µm Durchmesser in Tieren mit einem SDHD +/- Defekt unter Hypoxie einen Verlust der hypoxischen Vasokonstriktion aufweisen. In Zusammenhang mit diesen Untersuchungen lassen die eigenen Untersuchungen darauf schließen, dass es diesbezügliche Unterschiede zu größeren Gefäßen in Bezug auf die untersuchten

SDHD +/- Tiere gibt, da in den in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen isolierten Lungenversuchen nur Widerstandsgefäße der pulmonalen Strombahn erfasst wurden, die größere Gefäßdurchmesser als 40µm auswiesen. Auch sind kongenitale Effekte des globalen heterozygoten SDHD +/- Gendefekts in Betracht zu ziehen. Der SDHD könnte also eine wesentliche Bedeutung für die Regulation der HPV zukommen, die jedoch in weiterführenden Untersuchungen, z. B. an konditionellen homozygoten SDHD -/- Tieren determiniert werden müsste.

Unter prolongierter dreistündiger Hypoxie zeigten die SDHD +/- Tiere eine zu den Wildtypen signifikant erhöhte Vasokonstriktion zum Ende einer dreistündigen hypoxischen Ventilation. Die unterstreicht eine mögliche differentielle Bedeutung des

SDH-Defekts nicht nur für die akute, sondern auch für die prolongierte HPV, hier als möglicher Antagonist.

6) Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) has been known long since, intensive research on the ventilation-/perfusion matching mechanism of the lung started in 1946 with the studies of Euler and Liljestrand. Despite intensive research, the underlying mechanism(s) of oxygen sensing cell(s), pathway(s) of signal transduction and effector cell(s) have not yet been fully understood. HPV is responsible for pulmonary ventilation-/ perfusion matching, chronic hypoxia leads to pulmonary hypertension (PH) and to vascular remodeling. HPV could be playing an important role in the development of PH, however PH could also be caused by different mechanisms yet to be discovered. Succinate dehydrogenase (SDH), a mitochondrial enzyme in the respiratory chain and in the Krebs cycle, consists of four subunits. Mitochondria are being discussed as possible mediators of HPV and vascular remodeling as a result of chronic hypoxia. In this investigation mice with a heterozygous genetic deficiency for subunit D of SDH were used. Resulting from the heterozygote deficiency in SDHD was a SDHD activity lowered by 50%, an upregulation of the remaining gene could be excluded. Until today studying heterozygote genetically deficient mice as described above (SDHD +/-) is the only way to research SDHD deficiency without depending on pharmacological intervention.

The “isolated perfused lung” as an experimental setting gives the opportunity to focus on the lung separated from the organism and therefore independent of its influences but still acting largely as one unit in its original physiological way. In this model tissues were exposed to acute hypoxia or the thromboxan analogon U-46619 while changes in pulmonary artery pressure were registered. The experiments were performed with animals that had previously been kept under chronic hypoxic (10% oxygen, normobaric) or normoxic conditions for three weeks. The experiments were performed in the absence and presence of the nitric-oxide(NO)-synthetase inhibitor L-NG-nitroarginine (L-NNA). Results showed a significant reduction of HPV under the influence of L-NNA in animals previously kept under chronic hypoxic condition in comparison to the pulmonary vasoconstriction induced by U-46619 and in comparison to HPV of animals previously kept under normoxic conditions. This suggests a mechanism of

downregulation of HPV under chronic hypoxia which is independent from NO; a difference in genotype (Wildtyp vs. SDHD+/-) could not be detected in this setting.

Further experiments concentrated on the pulmonary vasoconstriction of the lungs exposed to a prolonged hypoxic ventilation phase of three hours. Here SDHD +/- animals were acting on a higher level of hypoxic pulmonary vasoconstriction towards the end of the three hour trial. This highlights the importance of a functioning SDHD antagonising the strength of hypoxic pulmonary vasoconstriction in prolonged hypoxia, and draws attention to differences in the regulating mechanisms underlying prolonged hypoxic vasoconstriction versus acute hypoxic vasoconstriction.

In histological examination the grade of muscularisation of intrapulmonary vessels was the focus of interest. Pulmonary vessels of animals previously kept under chronic hypoxic (10% oxygen, normobaric) or normoxic conditions were histologically evaluated and classified into three sizes (20-70µm, >70-150µm and >150µm). Subsequently the vessels of different calibers were analyzed considering their grade of muscularisation.

Significant differences between genotypes could not be shown, still the grade of full vascularisation was higher for small vessels after animals had previously been kept under hypoxic conditions.

Paddenberg et al. (2012) demonstrated that intraacinary vessels of 20-40µm in diameter originating from SDHD +/- animals presented with a loss of hypoxic vasoconstriction under hypoxia.

Concerning Paddenbergs et al. results the findings on hand suggest differences between vessels of 20-40µm in diameter in comparison to larger vessels as the pulmonary vessels studied with the model of isolated lung were pulmonary resistive vessels of 40µm or more in diameter. Congenital effects of global heterozygote deficiency have to be considered additionally. SDHD could be holding a key position in the regulation of HPV, further investigation preferably on conditionally homozygotic SDHD -/- animals are necessary to clarify this position.

Under three hours of prolonged hypoxia SDHD +/- animals presented with a significantly higher level of vasoconstriction towards the end of the experiments. This highlights a possible additional influence of SDH deficiency not only in acute but also in prolonged hypoxia, here as a possible antagonist.

7) Verzeichnisse

7. 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A/D-Wandlerkarte	Analog/Digital-Wandlerkarte
ALK-1	Activin receptor-like kinase type 1
α -KA	α -Ketosäure
APAH	Assoziierte pulmonalerterielle Hypertonie
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type II
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CTEPH	Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien
cGMP	Zyklisches Guanosin Monophosphat
cm	Zentimeter
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease- Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CO ₂	Kohlendioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyleneiodonium
Dr.	Doktor
Dr. med.	Doctor medicinae
Dr. rer. nat.	Doctor rerum naturalium
ET	Endothelin
ET _A -Rezeptor	Endothelin _A -Rezeptor
ET _β -Rezeptor	Endothelin _β -Rezeptor
eNOS	endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

FPAH	Familiäre pulmonalerterielle Hypertonie
g	Gramm
HIF	Hypoxia Inducible Factors, durch Hypoxie induzierbare Faktoren
HIV	Hummanes Immundefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMV	Herzminutenvolumen
HPV	Hypoxic Pulmonary Vasokonstriktion, hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HWZ	Halbwertszeit
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
i.v.	intraventös
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kv-Kanäle	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
L-NNA	L-NG-Nitroarginin
M	Molar
m	Meter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MN	Montana

M.O.M.	Mouse On Mouse
MW	Mittelwert
n	Numerus, Zahl
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NJ	New Jersey
nM	Nanomol
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PAH	Pulmonary Arterial Hypertension, pulmonalerterielle Hypertonie
PAP	Pulmonal Arterial Pressure, pulmonalerterieller Druck
ΔPAP	pulmonalerterieller Druckunterschied
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Personal Computer
PCH	Pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PDE	Phosphodiesterase
PEEP	Positiv Endexpiratory Pressure, positiver endexpiratorischer Druck
PH	Pulmonary Hypertension, pulmonale Hypertonie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPHN	Persistierende Pulmonalerterielle Hypertonie des Neugeborenen
Prof.	Professor/in
PVOD	Pulmonary venoocclusive disease, pulmonale venookklusive Erkrankung
Q	In Abbildung 2 entsprechend Coenzym Q
QH ₂	Ubichinol
®	Registered in U.S. Patent and Trademark Office, Schutzmarke
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

SEM	Standardfehler
SDH	Succinatdehydrogenase
SDHD	Succinatdehydrogenase-Untereinheit D
SDHD +/-	Succinatdehydrogenase- Untereinheit D, heterozygot gendifizient
SOD	Superoxid- Dismutase
Tab.	Tabelle
TM	Trade mark
TRP	Transienter Rezeptorpotential-Kationenkanal
TRPC6	Transienter Rezeptorpotential-Kationenkanal 6
U	Unit, Einheit
u.a.	Unter anderem
UK	United Kingdom
U.S.	United States
USA	United States of America
vs.	versus
vWF	von Wildebrand Faktor
W	Watt

7. 2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Succinatdehydrogenase (modifiziert nach [73])
Abb. 2	Schematische Darstellung der Succinatdehydrogenase-Aktivität unter normoxischen Bedingungen
Abb. 3	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Modell der isoliert perfundierten Lunge
Abb. 4	Versuchsablauf der akuten hypoxischen Ventilation, sowie der im Anschluss erfolgten Versuche mit U-46619. Dann Zugabe von L-NNA und erneute akute hypoxische Ventilation, sowie Gabe von U-46619 unter Einwirkung von L-NNA.
Abb. 5	Versuchsablauf der akuten hypoxischen Ventilation
Abb. 6	Versuchsablauf unter Normoxie und Zugabe von U-46619
Abb. 7	Versuchsablauf unter wechselnder Normoxie und Hypoxie in Gegenwart von L-NNA
Abb. 8	Versuchsablauf unter Normoxie bei Zugabe von U-46619 in Gegenwart von L-NNA
Abb. 9	Versuchsablauf unter prolongierter, dreistündiger Hypoxie
Abb. 10	Versuchsablauf der dreistündigen Normoxie
Abb. 11	Stärke der hypoxischen Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäusungen nach chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) oder normoxischer (21% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 12	Normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) in Wildtyp und SDHD +/- Mäusungen nach chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) oder normoxischer (21% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 13	Stärke der U-46619-induzierten Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäusungen nach chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) oder normoxischer (21% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 14	Normoxischer pulmonalarterieller Druck (PAP) in Wildtyp und SDHD +/- Mäusungen nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 15	Stärke der hypoxischen und U-46619-induzierten Vasokonstriktion in SDHD

	+/- und Wildtyp Mäuselungen nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 16	Normoxischer pulmonalerarterieller Druck (PAP) in Wildtyp -und SDHD +/- Mäuselungen vor akuter Hypoxie und vor U-46619-induzierter Vasokonstriktion nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 17	Stärke der hypoxischen Vasokonstriktion in SDHD +/- und Wildtyp Mäuselungen nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung in Gegenwart von L-NNA
Abb. 18	Normoxischer pulmonalerarterieller Druck (PAP) nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung in Gegenwart von L-NNA in Wildtyp- und SDHD +/- Mäuselungen vor akuter Hypoxie
Abb. 19	Stärke des pulmonalerarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) als Reaktion auf U-46619 in SDHD +/- und Wildtyp-Mäuselungen nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung und in Gegenwart von L-NNA
Abb. 20	Normoxischer pulmonalerarterieller Druck (PAP) in Gegenwart von L-NNA in Wildtyp- und SDHD +/- Lungen vor zwei U-46619-Boli nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 21	Stärke des pulmonalerarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) als Reaktion auf akute hypoxische Ventilation oder U-46619-Zugabe in SDHD +/- und Wildtyp-Mäuselungen nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung; in Gegenwart von L-NNA
Abb. 22	Normoxischer pulmonalerarterieller Druck (PAP) in Gegenwart von L-NNA in Wildtyp- und SDHD +/- Lungen vor akuter hypoxischer Ventilation und vor Zugabe von U-46619 nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 23	Stärke des pulmonalerarteriellen Druckanstiegs (Δ PAP) als Reaktion auf akute hypoxische Ventilation und U-46619-Zugabe in SDHD +/- und Wildtyp-Mäuselungen, nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer (10% O ₂ , normobar) Haltung, mit und ohne Gegenwart von

	L-NNA
Abb. 24	Pulmonalarterieller Druckunterschied (Δ PAP) unter dreistündige hypoxischer (1% O ₂) oder normoxischer (21% O ₂) Ventilation
Abb. 25	Hämatokritwerte der normoxisch (21% O ₂ , normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O ₂ , normobar) gehaltenen Wildtypen und SDHD +/- Tiere
Abb. 26	Rechtsventrikulärer Druck der normoxisch (21% O ₂ , normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O ₂ , normobar) gehaltenen Mäuse beider Genotypen
Abb. 27	Herzgewichte des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels inklusive Septum ventriculi von normoxisch (21% O ₂ , normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O ₂ , normobar) gehaltenen Mäusen
Abb. 28	Gewichtsverhältnis rechter Ventrikel zum linken Ventrikel der Herzen mit Septum von normoxisch (21% O ₂ , normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O ₂ , normobar) gehaltenen Mäusen
Abb. 29	Gewichtsdifferenz im Körpergewicht der Tiere nach normoxischer (21% O ₂ , normobar) oder chronischer hypoxischer 10% O ₂ , normobar) Haltung
Abb. 30	Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zum Körpergewicht von normoxisch (21% O ₂ , normobar) oder chronisch hypoxisch (10% O ₂ , normobar) gehaltenen Mäusen
Abb. 31	Muskularisierungsgrad kleiner Gefäße (20-70µm)
Abb. 32	Muskularisierungsgrad mittlerer Gefäße (> 70-150µm)
Abb. 33	Muskularisierungsgrad großer Gefäße (>150µm)

7. 3 Literaturverzeichnis

- [1] U. S. V Euler and G. Liljestrand, "Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 12, no. 4, pp. 301–320, 1946.
- [2] R. M. Bois, "Primary pulmonary hypertension Rubin LJ: Chest 104:236," *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, vol. 8, no. 1, pp. 127–127, 1994.
- [3] N. Sommer, A. Dietrich, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, T. Gudermann, R. Schulz, W. Seeger, F. Grimminger, and N. Weissmann, "Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms.," *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.*, vol. 32, no. 6, pp. 1639–1651, 2008.
- [4] N. Weissmann, N. Sommer, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger, "Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 71, no. 4, pp. 620–629, 2006.
- [5] Hans-Joachim Schäfer, *Pulmonale Hypertonie*. Blackwell Wissenschaft, Kapitel 1.1, 2001
- [6] N. G. Gibbs, "ESC Guidelines for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension," *Eur. Heart J.*, vol. 30, 2493–2, 2009.
- [7] G. Simonneau, I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z.-C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, and R. Souza, "Updated clinical classification of pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, no. 1 Suppl, pp. S43–S54, 2009.
- [8] N. Weissmann, F. Grimminger, A. Olschewski, and W. Seeger, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?," *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, vol. 281, no. 2. pp. L314–L317, 2001.
- [9] N. Weissmann, S. Zeller, R. U. Schäfer, C. Turowski, M. Ay, K. Quanz, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, L. Fink, W. Seeger, and F. Grimminger, "Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 505–513, 2006.
- [10] J. T. Sylvester, L. A. Shimoda, P. I. Aaronson, and J. P. T. Ward, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 1, pp. 367–520, 2012.
- [11] M. Rabinovitch, W. Gamble, A. S. Nadas, O. S. Miettinen, and L. Reid, "Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features.," *Am. J. Physiol.*, vol. 236, no. 6, pp. H818–H827, 1979.

- [12] M. G. F. Kurt R. Stenmark, Karen A. Fagan, “Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Cellular and Molecular Mechanisms,” *Circ Res.*, vol. 99, pp. 675–691, 2006.
- [13] R. J. Barst, “A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 334, no. 5, pp. 296–301, 1996.
- [14] K. Ahmadi-Simab, P. Lamprecht, B. Hellmisch, and W. L. Gross, “Treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH) with oral endothelin-receptor antagonist bosentan in systemic sclerosis: BREATHE-1 trial and clinical experience,” *Z. Rheumatol.*, vol. 63, no. 6, pp. 495–497, 2004.
- [15] L. Rubin, D. Badesch, R. Barst, N. Galie, C. Black, A. Keogh, T. Pulido, A. Frost, S. Roux, I. Leconte, M. Landzberg, and G. Simonneau, “Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 12, pp. 896–903, 2002.
- [16] T. Pulido, I. Adzerikho, R. N. Channick, M. Delcroix, N. Galiè, H.-A. Ghofrani, P. Jansa, Z.-C. Jing, F.-O. Le Brun, S. Mehta, C. M. Mittelholzer, L. Perchenet, B. K. S. Sastry, O. Sitbon, R. Souza, A. Torbicki, X. Zeng, L. J. Rubin, and G. Simonneau, “Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 9, pp. 809–18, 2013.
- [17] H. A. Ghofrani, R. Wiedemann, F. Rose, R. T. Schermuly, H. Olschewski, N. Weissmann, A. Gunther, D. Walrmath, W. Seeger, and F. Grimminger, “Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial,” 2002.
- [18] S. Archer and S. Rich, “Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research ‘Work in progress’,” *Circulation*, vol. 102, no. 22, pp. 2781–2791, 2000.
- [19] Fachinformation Adempas® (Bayer Healthcare), “Bayer Pharma AG, 13342 Berlin, Deutschland,” <http://www.bayerhealthcare.at/html/pdf/gi/Adempas.pdf>, 2014.
- [20] H.-A. Ghofrani, A. M. D’Armini, F. Grimminger, M. M. Hoeper, P. Jansa, N. H. Kim, E. Mayer, G. Simonneau, M. R. Wilkins, A. Fritsch, D. Neuser, G. Weimann, and C. Wang, “Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 4, pp. 319–29, 2013.
- [21] F. Grimminger, N. Weissmann, R. Spriestersbach, E. Becker, S. Rosseau, and W. Seeger, “Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs,” *Am. J. Physiol.*, vol. 268, no. 2, pp. 159–169, 1995.

- [22] M. D. Peake, A. L. Harabin, N. J. Brennan, and J. T. Sylvester, "Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 1214–1219, 1981.
- [23] E. D. Robin, J. Theodore, C. M. Burke, S. N. Oesterle, M. B. Fowler, S. W. Jamieson, J. C. Baldwin, A. J. Morris, S. A. Hunt, and A. Vankessel, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction persists in the human transplanted lung.," *Clin. Sci. London Engl. 1979*, vol. 72, no. 3, pp. 283–287, 1987.
- [24] C. A. Dawson, D. J. Grimm, and J. H. Linehan, "Influence of hypoxia on the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 44, no. 4, pp. 493–498, 1978.
- [25] S. C. Hillier, J. A. Graham, C. C. Hanger, P. S. Godbey, R. W. Glenny, and W. W. Wagner, "Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 82, no. 4, pp. 1084–1090, 1997.
- [26] M. Kato and N. C. Staub, "Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia.," *Circ. Res.*, vol. 19, no. 2, pp. 426–440, 1966.
- [27] N. C. Staub, "Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Chest*, vol. 88, no. 4 Suppl, p. 240S–245S, 1985.
- [28] J. Q. Liu, J. S. K. Sham, L. A. Shimoda, P. Kuppusamy, and J. T. Sylvester, "Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 285, no. 2, pp. L322–L333, 2003.
- [29] J. A. Madden, M. S. Vadula, and V. P. Kurup, "Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells.," *Am. J. Physiol.*, vol. 263, no. 3 Pt 1, pp. L384–L393, 1992.
- [30] T. R. Murray, L. Chen, B. E. Marshall, and E. J. Macarak, "Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 457–465, 1990.
- [31] G. B. Waypa, J. D. Marks, M. M. Mack, C. Boriboun, P. T. Mungai, and P. T. Schumacker, "Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes.," *Circ. Res.*, vol. 91, no. 8, pp. 719–726, 2002.
- [32] E. D. Michelakis, V. Hampl, A. Nsair, X. Wu, G. Harry, A. Haromy, R. Gurtu, and S. L. Archer, "Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing.," *Circ. Res.*, vol. 90, no. 12, pp. 1307–1315, 2002.
- [33] P. I. Aaronson, T. P. Robertson, and J. P. T. Ward, "Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 132, no. 1, pp. 107–120, 2002.

- [34] K. K. Griendling, D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.," *Circ. Res.*, vol. 86, no. 5, pp. 494–501, 2000.
- [35] B. Lassègue and R. E. Clempus, "Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 285, no. 2, pp. R277–R297, 2003.
- [36] H. M. Thomas, R. C. Carson, E. D. Fried, and R. S. Novitch, "Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by diphenyleneiodonium.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, no. 7, pp. R9–R12, 1991.
- [37] C. Marshall, A. J. Mamary, A. J. Verhoeven, and B. E. Marshall, "Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 633–644, 1996.
- [38] M. S. Wolin, T. M. Burke-Wolin, and K. M. Mohazzab-H, "Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms.," *Respir. Physiol.*, vol. 115, no. 2, pp. 229–238, 1999.
- [39] G. B. Waypa, N. S. Chandel, and P. T. Schumacker, "Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing.," *Circ. Res.*, vol. 88, no. 12, pp. 1259–1266, 2001.
- [40] N. Weissmann, N. Ebert, M. Ahrens, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, J. Hänze, L. Fink, F. Rose, J. Conzen, W. Seeger, and F. Grimminger, "Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 721–732, 2003.
- [41] P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders, and S.-S. Sheu, "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 287, no. 4, pp. C817–33, 2004.
- [42] D. Han, F. Antunes, R. Canali, D. Rettori, and E. Cadenas, "Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 8, pp. 5557–5563, 2003.
- [43] M. S. Wolin, "Interactions of Oxidants With Vascular Signaling Systems," *Arterioscler. Thromb.*, vol. 20, no. 6, pp. 1430–1442, 2000.
- [44] R. M. Drummond and R. A. Tuft, "Release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial [Ca²⁺] in rat pulmonary artery smooth muscle cells," *J. Physiol.*, vol. 516 (Pt 1, no. Pt 1, pp. 139–147, 1999.
- [45] Q. Wang, Y. X. Wang, M. Yu, and M. I. Kotlikoff, "Ca(2+)-activated Cl⁻ currents are activated by metabolic inhibition in rat pulmonary artery smooth muscle cells.," *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 2 Pt 1, pp. C520–C530, 1997.

- [46] V. Hampl and J. Herget, "Possible mechanisms of oxygen sensing in the pulmonary circulation.," *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*, vol. 40, no. 5, pp. 463–470, 1991.
- [47] X. J. Yuan, M. L. Tod, L. J. Rubin, and M. P. Blaustein, "Hypoxic and metabolic regulation of voltage-gated K⁺ channels in rat pulmonary artery smooth muscle cells.," *Exp. Physiol.*, vol. 80, no. 5, pp. 803–813, 1995.
- [48] A. M. Evans, K. J. W. Mustard, C. N. Wyatt, C. Peers, M. Dipp, P. Kumar, N. P. Kinnear, and D. G. Hardie, "Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells?," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 15, pp. 41504–41511, 2005.
- [49] R. M. Leach, D. W. Sheehan, V. P. Chacko, and J. T. Sylvester, "Energy state, pH, and vasomotor tone during hypoxia in precontracted pulmonary and femoral arteries.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 278, no. 2, pp. L294–L304, 2000.
- [50] R. M. Leach, H. M. Hill, V. A. Snetkov, T. P. Robertson, and J. P. T. Ward, "Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor.," *J. Physiol.*, vol. 536, no. Pt 1, pp. 211–224, 2001.
- [51] C. Huckstorf, T. Streller, and H. Acker, "An unusual cytochrome a₅₉₂ with low PO₂ affinity correlates with afferent discharge in the carotid body.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 536, pp. 75–83, 2003.
- [52] H. Acker, "The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species.," *Philos. Trans. R. Soc. London - Ser. B Biol. Sci.*, vol. 360, no. 1464, pp. 2201–2210, 2005.
- [53] M.-J. Lin, G. P. H. Leung, W.-M. Zhang, X.-R. Yang, K.-P. Yip, C.-M. Tse, and J. S. K. Sham, "Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension.," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 5, pp. 496–505, 2004.
- [54] S. S. McDaniel, O. Platoshyn, J. Wang, Y. Yu, M. Sweeney, S. Krick, L. J. Rubin, and J. X. Yuan, "Capacitative Ca(2⁺) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 280, no. 5, pp. L870–L880, 2001.
- [55] P. I. Aaronson, T. P. Robertson, G. A. Knock, S. Becker, T. H. Lewis, V. Snetkov, and J. P. T. Ward, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies.," *J. Physiol.*, vol. 570, no. Pt 1, pp. 53–58, 2006.

- [56] J. M. Post, J. R. Hume, S. L. Archer, and E. K. Weir, "Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 4 Pt 1, pp. C882–C890, 1992.
- [57] J. T. Hulme, E. A. Coppock, A. Felipe, J. R. Martens, and M. M. Tamkun, "Oxygen sensitivity of cloned voltage-gated K(+) channels expressed in the pulmonary vasculature.," *Circ. Res.*, vol. 85, no. 6, pp. 489–497, 1999.
- [58] N. Weissmann, A. Dietrich, B. Fuchs, H. Kalwa, M. Ay, R. Dumitrascu, A. Olschewski, U. Storch, M. Mederos Y Schnitzler, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, O. Pinkenburg, W. Seeger, F. Grimminger, and T. Gudermann, "Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 50, pp. 19093–19098, 2006.
- [59] N. Weissmann, F. Grimminger, R. Voswinckel, J. Conzen, and W. Seeger, "Nitro blue tetrazolium inhibits but does not mimic hypoxic vasoconstriction in isolated rabbit lungs.," *Am. J. Physiol.*, vol. 274, no. 5 Pt 1, pp. L721–L727, 1998.
- [60] X. W. Fu, D. Wang, C. A. Nurse, M. C. Dinauer, and E. Cutz, "NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: Evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 8, pp. 4374–4379, 2000.
- [61] F. Ichinose, R. Ullrich, A. Sapirstein, R. C. Jones, J. V Bonventre, C. N. Serhan, K. D. Bloch, and W. M. Zapol, "Cytosolic phospholipase A₂ in hypoxic pulmonary vasoconstriction," *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 11, pp. 1493–1500, 2002.
- [62] Z. Shmelzer, N. Haddad, E. Admon, I. Pessach, T. L. Leto, Z. Eitan-Hazan, M. Hershfinkel, and R. Levy, "Unique targeting of cytosolic phospholipase A₂ to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes.," *J. Cell Biol.*, vol. 162, no. 4, pp. 683–692, 2003.
- [63] E. D. Michelakis, B. Thébaud, E. K. Weir, and S. L. Archer, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1119–1136, 2004.
- [64] F. Grimminger, R. Spriestersbach, N. Weissmann, D. Walmrath, and W. Seeger, "Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 78, no. 4, pp. 1509–1515, 1995.
- [65] R. Spriestersbach, F. Grimminger, N. Weissmann, D. Walmrath, and W. Seeger, "On-line measurement of nitric oxide generation in buffer-perfused rabbit lungs.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 78, no. 4, pp. 1502–1508, 1995.
- [66] M. S. Wolin, M. Ahmad, and S. A. Gupte, "Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and

- potential importance of cytosolic NADPH.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 289, no. 2, pp. L159–L173, 2005.
- [67] S. A. Gupte, P. M. Kaminski, B. Floyd, R. Agarwal, N. Ali, M. Ahmad, J. Edwards, and M. S. Wolin, "Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries.," *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.*, vol. 288, no. 1, pp. H13–H21, 2005.
 - [68] N. S. Chandel and P. T. Schumacker, "Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms.," *FEBS Lett.*, vol. 454, no. 3, pp. 173–176, 1999.
 - [69] R. Paddenberger, A. Goldenberg, P. Faulhammer, R. C. Braun-Dullaeus, and W. Kummer, "Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced ROS generation and vasoconstriction in the pulmonary vasculature.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 536, pp. 163–169, 2003.
 - [70] E. L. Bell, T. A. Klimova, J. Eisenbart, P. T. Schumacker, and N. S. Chandel, "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Extension of the Replicative Life Span during Hypoxia," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 16, pp. 5737–5745, 2007.
 - [71] S. L. Archer, J. Huang, T. Henry, D. Peterson, and E. K. Weir, "A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature.," *Circ. Res.*, vol. 73, no. 6, pp. 1100–1112, 1993.
 - [72] S. Rounds and I. F. McMurtry, "Inhibitors of oxidative ATP production cause transient vasoconstriction and block subsequent pressor responses in rat lungs.," *Circ. Res.*, vol. 48, no. 3, pp. 393–400, 1981.
 - [73] R. (Zephyris) Wheeler, "Succinate Dehydrogenase," *Wikipedia, By Zephyris en.wikipedia [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>), CC-BY-SA-3.0 or GFDL (www.gnu.org/copyleft/fdl.html)], from Wikimedia Commons*, uploaded 2007.
 - [74] H. P. C. Löffler Georg H., Petrides Petro E., *Biochemie und Pathobiochemie.*, p. 497, Springer Verlag, 8. Auflage, 2007.
 - [75] F. Horn, *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium.*, Thieme Verlag, 2. Auflage, p. 207, 2003.
 - [76] R. Paddenberger, B. Ishaq, A. Goldenberg, P. Faulhammer, F. Rose, N. Weissmann, R. C. Braun-Dullaeus, and W. Kummer, "Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 284, no. 5, pp. L710–L719, 2003.

- [77] R. Paddenberger, P. König, P. Faulhammer, A. Goldenberg, U. Pfeil, and W. Kummer, "Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices," *Respir. Res.*, vol. 7, no. 1, p. 93, 2006.
- [78] E. M. Redout, M. J. Wagner, M. J. Zuidwijk, C. Boer, R. J. Musters, C. Van Hardeveld, W. J. Paulus, and W. S. Simonides, "Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species," *Cardiovasc. Res.*, vol. 75, no. 4, pp. 770–781, 2007.
- [79] G. L. Semenza, "Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1.," *Biochem. J.*, vol. 405, no. 1, pp. 1–9, 2007.
- [80] C. L. Dalgard, H. Lu, A. Mohyeldin, and A. Verma, "Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors.," *Biochem. J.*, vol. 380, no. Pt 2, pp. 419–424, 2004.
- [81] M. A. Selak, S. M. Armour, E. D. MacKenzie, H. Boulahbel, D. G. Watson, K. D. Mansfield, Y. Pan, M. C. Simon, C. B. Thompson, and E. Gottlieb, "Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase.," *Cancer Cell*, vol. 7, no. 1, pp. 77–85, 2005.
- [82] E. F. Hensen and J.-P. Bayley, "Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma," *Fam. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 355–363, 2011.
- [83] P. Koivunen and K. I. Kivirikko, "Inhibition of Hypoxia-inducible Factor (HIF) Hydroxylases by Citric Acid Cycle Intermediates," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 7, pp. 4524–4532, 2007.
- [84] J. Mühlhling, R. Paddenberger, G. Hempelmann, and W. Kummer, "Hypobaric hypoxia affects endogenous levels of α -keto acids in murine heart ventricles.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 342, no. 3, pp. 935–939, 2006.
- [85] J. Mühlhling, M. Tiefenbach, J. López-Barneo, J. I. Piruat, P. García-Flores, U. Pfeil, B. Gries, C. Mühlfeld, M. A. Weigand, W. Kummer, N. Weissmann, and R. Paddenberger, "Mitochondrial complex II participates in normoxic and hypoxic regulation of α -keto acids in the murine heart.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 49, no. 6, pp. 950–961, 2010.
- [86] U. E. Witkowski, R., Prokop O., *Lexikon der Syndrome und Fehlbildungen: Ursachen, Genetik, Risiken*. Springer Verlag, 7. Auflage, 2003.
- [87] B. E. Baysal, "Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma," *Science (80-.)*, vol. 287, no. 5454, pp. 848–851, 2000.

- [88] H. J. L. M. Timmers, K. Pacak, J. Bertherat, J. W. M. Lenders, M. Duet, G. Eisenhofer, C. A. Stratakis, P. Niccoli-Sire, B. H. P. Tran, N. Burnichon, and A.-P. Gimenez-Roqueplo, *Mutations associated with succinate dehydrogenase D-related malignant paragangliomas.*, vol. 68, no. 4. 2008, pp. 561–566.
- [89] B. E. Baysal, “On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma.” *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, vol. 14, no. 10, pp. 453–459, 2003.
- [90] M. R. Wick, “Neuroendocrine neoplasia. Current concepts.” *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 113, no. 3. pp. 331–335, 2000.
- [91] I. Piruat, C. O. Pintado, P. Ortega-sa, and M. Roche, “The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia,” *Society*, vol. 24, no. 24, pp. 10933–10940, 2004.
- [92] J. Arias-Stella and J. Valcarcel, “The human carotid body at high altitudes.” *Pathol. Microbiol. (Basel).*, vol. 39, no. 3, pp. 292–297, 1973.
- [93] K. Astrom, J. E. Cohen, J. E. Willett-Brozick, C. E. Aston, and B. E. Baysal, “Altitude is a phenotypic modifier in hereditary paraganglioma type 1: evidence for an oxygen-sensing defect.” *Hum. Genet.*, vol. 113, no. 3, pp. 228–237, 2003.
- [94] M. J. Saldana, L. E. Salem, and R. Travezan, “High altitude hypoxia and chemodectomas.” *Hum. Pathol.*, vol. 4, no. 2, pp. 251–263, 1973.
- [95] A. King, M. Selak, and E. Gottlieb, “Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer,” *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4675–4682, 2006.
- [96] M. Stefanini, C. De Martino, and L. Zamboni, “Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy.” *Nature*, vol. 216, no. 5111, pp. 173–174, 1967.
- [97] S. E. H. Knowlton F. P., “The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart,” *J Physiol.*, vol. 44(3), pp. 206–219, 1912.
- [98] K. L. Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer HJ, Ermert L, “Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs.” *Methods Enzym.*, vol. 1994;233:5, 1993.
- [99] N. Weissmann, E. Akkayagil, K. Quanz, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, L. Fink, J. Hänze, F. Rose, W. Seeger, and F. Grimminger, “Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice.” *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 139, no. 2, pp. 191–202, 2004.

- [100] S. Rimar and C. N. Gillis, "Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation.," *Circulation*, vol. 88, no. 6, pp. 2884–2887, 1993.
- [101] D. Walrmath, R. Schermuly, J. Pilch, F. Grimminger, and W. Seeger, "Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension.," *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1084–1092, 1997.
- [102] C. Martin, V. Ullrich, and S. Uhlig, "Effects of the thromboxane receptor agonist U46619 and endothelin-1 on large and small airways.," *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 316–323, 2000.
- [103] M. Roth, M. Rupp, S. Hofmann, M. Mittal, B. Fuchs, N. Sommer, N. Parajuli, K. Quanz, D. Schubert, E. Dony, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, U. Sausbier, K. Rutschmann, S. Wilhelm, W. Seeger, P. Ruth, F. Grimminger, M. Sausbier, and N. Weissmann, "Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: lung vascular effects of hypoxia.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 180, no. 4, pp. 353–364, 2009.
- [104] A.-P. Gimenez-Roqueplo, J. Favier, P. Rustin, J.-J. Mourad, P.-F. Plouin, P. Corvol, A. Rötig, and X. Jeunemaitre, "The R22X Mutation of the SDHD Gene in Hereditary Paraganglioma Abolishes the Enzymatic Activity of Complex II in the Mitochondrial Respiratory Chain and Activates the Hypoxia Pathway," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 69, no. 6, pp. 1186–1197, 2001.
- [105] P. B. Douwes Dekker, P. C. W. Hogendoorn, N. Kuipers-Dijkshoorn, F. A. Prins, S. G. Van Duinen, P. E. M. Taschner, A. G. L. Van Der Mey, and C. J. Cornelisse, "SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology.," *J. Pathol.*, vol. 201, no. 3, pp. 480–486, 2003.
- [106] R. T. Schermuly, C. Inholte, H. A. Ghofrani, H. Gall, N. Weissmann, A. Weidenbach, W. Seeger, and F. Grimminger, "Lung vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension: amplification by different type phosphodiesterase inhibitors," *Respir. Res.*, vol. 6, no. 1, p. 76, 2005.
- [107] G. B. Waypa and P. T. Schumacker, "Role for mitochondrial reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction.," *Novartis Found. Symp.*, vol. 272, pp. 176–192; discussion 192–195, 214–217, 2006.
- [108] E. D. Michelakis, B. Thébaud, E. K. Weir, and S. L. Archer, "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O_2 -sensitive K^{+} channels by a mitochondrial O_2 -sensor in resistance artery smooth muscle cells.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1119–1136, 2004.

- [109] T. C. Isaacson, V. Hampl, E. K. Weir, D. P. Nelson, and S. L. Archer, "Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 76, no. 2, pp. 933–940, 1994.
- [110] H. L. Reeve, E. Michelakis, D. P. Nelson, E. K. Weir, and S. L. Archer, "Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 90, no. 6, pp. 2249–2256, 2001.
- [111] F. S. Scornik and L. Toro, "U46619, a thromboxane A2 agonist, inhibits KCa channel activity from pig coronary artery," *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 262, no. 3, p. C708, 1992.
- [112] P. J. Pollard, N. C. Wortham, and I. P. M. Tomlinson, "The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase.," *Ann. Med.*, vol. 35, no. 8, pp. 632–639, 2003.
- [113] C. Pawlu, B. Bausch, and H. P. H. Neumann, "Mutations of the SDHB and SDHD genes.," *Fam. Cancer*, vol. 4, no. 1, pp. 49–54, 2005.
- [114] V. H. Busch, "Quantitative histochemische und immunhistochemische Darstellung der Succinatdehydrogenaseaktivität und der Proteinuntereinheiten in Herz und Lunge der Ratte," Elektronische Bibliothek der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2008.
- [115] P. Haber, *Leitfaden Zur Medizinischen Trainingsberatung: Rehabilitation Bis Leistungssport*, 3. Auflage. Springer-Verlag/ WienNewYork, , p. 82, 2009.
- [116] J. Herget, A. J. Suggett, E. Leach, and G. R. Barer, "Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia.," *Thorax*, vol. 33, no. 4, pp. 468–473, 1978.
- [117] R. T. Antel, J., Hesselink, M.B., Schermuly, *Pulmonary Arterial Hypertension - Focusing on a Future: Enhancing and Extending Life*. Ios Press, 1. Auflage, pp. 59–60, 2010.
- [118] T. Larsen, R. Ziegenfuß, *Beatmung*. Springer Verlag, 3. Auflage, p. 13, Kapitel 1.2.7, 2004.
- [119] R. Paddenberger, M. Tiefenbach, P. Faulhammer, A. Goldenberg, B. Gries, U. Pfeil, K. S. Lips, J. I. Piruat, J. López-Barneo, R. T. Schermuly, N. Weissmann, and W. Kummer, "Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction of intra- but not of pre-acinar arteries.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 93, no. 4, pp. 702–710, 2012.

8) Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- R. Paddenberger, M. Tiefenbach, P. Faulhammer, A. Goldenberg, B. Gries, U. Pfeil, K. S. Lips, J. I. Piruat, J. López-Barneo, R. T. Schermuly, N. Weissmann, and W. Kummer, "Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction of intra- but not of pre-acinar arteries.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 93, no. 4, pp. 702–710, 2012.
- J. Mühling, M. Tiefenbach, J. López-Barneo, J. I. Piruat, P. García-Flores, U. Pfeil, B. Gries, C. Mühlfeld, M. A. Weigand, W. Kummer, N. Weissmann, and R. Paddenberger, "Mitochondrial complex II participates in normoxic and hypoxic regulation of α -keto acids in the murine heart.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 49, no. 6, pp. 950–961, 2010.

9) Erklärung

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten, sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder ich habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches deutlich kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt oder indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Gießen, Mai 2016

Martina Tiefenbach

10) Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann für die Themenstellung dieser Arbeit, die Möglichkeit zur Durchführung und insbesondere für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Er wird mir durch seine exzellente fachliche Kompetenz und seine detaillierte Arbeitsweise als Wissenschaftler immer ein großes Vorbild sein.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. med. W. Seeger, der diese Arbeit als Leiter der Medizinischen Klinik II ermöglicht hat.

Herrn Dr. U. Pfeil vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Genotypisierung der von mir verwendeten Mäuse. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Schermuly.

Für ihre tatkräftige Unterstützung bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Karin Quanz und bei Frau Dr. N. Sommer. Des Weiteren gilt mein besondere Dank Isa, Ingrid, Ewa, Eva, Akyl, Rio sowie dem ganzen Team der Arbeitsgruppe Weißmann für die gute Zusammenarbeit und das wunderbare Arbeitsklima. Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Đôn-Felix Ryżek für seine Hilfe im Englischen.

Bei Daniel Ratański bedanke ich mich von Herzen für seine sorgfältigen Korrekturen sowie für seine Fähigkeit, mich immer wieder neu zu ermutigen. Für ihre emotionale Unterstützung in allen Lebenslagen und für ihre Freundschaft bedanke ich mich herzlich bei Judith von Rechenberg.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meinen lieben Eltern Tessa und Hermann dafür, dass sie mir ermöglicht haben, diese Doktorarbeit zu schreiben. Ich bin sehr glücklich, dass ich meine beruflichen Wünsche mit Ihrer Hilfe verwirklichen konnte. Happy Birthday, Papa.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6468-6

